Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ORGANISATION UND REPLIKATION DER HISTONGENE IN HELA-ZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MARION MOOS

aus Lollar

Marburg/Lahn 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ORGANISATION UND REPLIKATION DER HISTONGENE IN HELA-ZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MARION MOOS

aus Lollar

Marburg/Lahn 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 31.8. 1979

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan Prof. Dr. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. Dr. P. Karlson
Korreferent: Prof. Dr. D. Gallwitz

Die vorliegende Arbeit wurde am
Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. D. Gallwitz
angefertigt.

Herrn Prof. Dr. D. Gallwitz möchte
ich für Unterstützung und anregende
Diskussion danken.

Ebenfalls danke ich dem Direktor des
Instituts für Physiologische Chemie,
Herrn Prof. Dr. Dr. P. Karlson, für
die Förderung der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0023

Inhaltsverzeichnis Seite

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	14
2.1.	Material	14
2.2.	Methoden	15
2.2.1.	Zellwachstum und Synchronisierung	15
2.2.2.	Markierung von HeLa-Zellen mit 5-Brom-desoxyuridin	15
2.2.3.	Markierung von HeLa-Zellen mit ^{14}C-Thymidin	16
2.2.4.	Isolierung von DNA aus HeLa-Zellen	17
2.2.5.	Größenbestimmung von mit 5-Bromdesoxyuridin markierter HeLa- und von menschlicher Placenta-DNA	18
2.2.6.	Fraktionierung von DNA auf CsCl-Dichte-gradienten	19
2.2.7.	Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli	20
2.2.7.1.	Präperation der Plasmid-DNA	21
2.2.7.2.	Überprüfung der Reinheit der präperierten Plasmid-DNA durch analytische Agarose-Gele	23
2.2.8.	Präperative Gewinnung des insertierten See-igel-Histongen-DNA-Abschnittes aus der Plasmid-DNA	24
2.2.8.1.	Schneiden der Plasmid-DNA mit Restriktions-enzymen	24
2.2.8.2.	Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese	25
2.2.8.3.	Präperative Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	26
2.2.8.4.	Isolierung des Seeigel-Histongen-DNA-Abschnittes	27
2.2.9.	In-vitro-Präperation einer ^{32}P-markierten komplementären RNA (cRNA) von gereinigter Seeigel-Histongen-DNA	28
2.2.10.	DNA-RNA-Hybridisierungen	30
2.2.10.1.	Denaturierung und Neutralisierung der DNA	30
2.2.10.2.	Aufbringen der denaturierten DNA-Proben auf Nitrocellulose-Filter	30
2.2.10.3.	Filterhybridisierung	31
2.2.11.	DNA-RNA-Hybridisierungen mit geschnittener Gesamt-HeLa- und Placenta-DNA	32

Seite

2.2.11.1. Schneiden von Placenta- und HeLa-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen 32
2.2.11.2. Auftrennung der geschnittenen DNA auf Agarose-Gelen 33
2.2.11.3. Überführung der DNA von den Agarose-Gelen auf Nitrocellulose-Filter nach der Methode von Southern (1975) 34
2.2.11.4. DNA-RNA-Filterhybridisierung 35
III. Ergebnisse 37
3.1. Zellsynchronisierung, DNA-Synthese und Nukleinsäurehybridisierung 37
3.1.1. DNA-Synthese in synchronisierten HeLa S3-Zellen 37
3.1.2. Einbau von 5-Bromdesoxyuridin in die DNA von HeLa S3-Zellen und Auftrennung von markierter und unmarkierter DNA auf CsCl-Dichtegradienten 39
3.1.3. Größe der mit 5-Bromdesoxyuridin markierten HeLa-DNA 42
3.1.4. Spezifität der Kreuz-Hybridisierung zwischen HeLa-DNA und komplementärer RNA (cRNA) von Seeigel-Histongen-DNA 42
3.1.5. Hybridisierung von HeLa-DNA gegen komplementäre RNA (cRNA) des Plasmids pBR 322 50
3.2. Hybridisierung von fraktionierter HeLa-DNA gegen komplementäre RNA (cRNA) von Seeigel-Histon-DNA 51
3.3. Replikation der Histongene während der S-Phase von HeLa-Zellen 57
3.4. Hybridisierung von Restriktionsfragmenten von HeLa- und Placenta-DNA gegen komplementäre RNA (cRNA) von Seeigel-Histongen-DNA 83
IV. Diskussion 90
V. Zusammenfassung 99
VI. Verzeichnis der Abkürzungen 101
VII. Literaturverzeichnis 102

I. Einleitung

Die DNA-Replikation höherer Organismen ist ein komplexer Vorgang, der auf mehreren Ebenen intensiv untersucht worden ist. Während der S-Phase des Zellzyklus verläuft die Replikation in vielen benachbarten, subchromosomalen Replikationseinheiten, den sogenannten Replikons, in denen von einem zentral gelegenen Initiationspunkt aus die Synthese der DNA in beiden Richtungen fortschreitet. Eine Vielzahl von Enzymen und Hilfsproteinen ist an diesem Prozeß beteiligt, ihre Charakterisierung und die Aufklärung ihrer funktionellen Bedeutung bildet einen Schwerpunkt molekularbiologischer und biochemischer Forschung. Besonderes Interesse verdient auch der zeitliche Ablauf der Replikation in bestimmten DNA-Abschnitten. Möglicherweise könnte man Kriterien in die Hand bekommen, mit denen man für bestimmte DNA-Abschnitte ihren Replikationszeitpunkt voraussagen und vielleicht auch eine Möglichkeit schaffen könnte, die betreffenden DNA-Abschnitte so isolieren zu können.

Die ersten Hinweise, daß die DNA-Replikation innerhalb der S-Phase des Zellzyklus höherer Organismen kein zufälliger, sondern vielmehr ein gerichteter Prozeß ist, stammten aus Untersuchungen, bei denen mit Hilfe radioaktiver Pulse-Markierungen in Verbindung mit histologischen und cytologischen Untersuchungen die Replikation bestimmter DNA- bzw. Chromosomenabschnitte definierten Zeiträumen in der S-Phase zugeordnet wurde. So zeigte Lima-de-Faria (1959) unter Zuhilfenahme der unterschiedlichen Anfärbbarkeit von sogenanntem Hetero- und Euchromatin, daß das Heterochromatin zu einem späteren Zeitpunkt repliziert wurde als das Euchromatin. Das Auftreten dieses einfachen Replikationsmusters wurde weiterhin bestätigt durch die Befunde, daß das Heterochromatin ähnlichen Regionen auf unterschiedlichen Chromosomen zugeordnet werden kann. So findet man heterochromatische Regionen oft in der Nähe des Zentromers, an den Enden der Chromosomen und in der Nähe des Organisationspunktes des Nukleolus. Weiterhin sind die Sex-Chromosomen hauptsächlich heterochromatisch (Brown, 1966). Diese Regionen werden zu einem späten Zeitpunkt in

der S-Phase repliziert. Taylor (1960) markierte Chinese Hamster-Zellen über einen bestimmten Zeitraum mit ^{3}H-Thymidin und untersuchte anschließend in verschiedenen Zeitabständen nach Fixierung der Metaphasenchromosomen die Markierung in bestimmten Chromosomenabschnitten. Die erste Probe, die nach dem Durchlaufen der G2-Phase markierte Chromosomen zeigte, repräsentierte folglich ein spätes Stadium in der S-Phase. Sie zeigte deutliche Markierung auf den Sex-Chromosomen. Mit dem gleichen System, allerdings unter Verwendung synchronisierter Zellen, die in bestimmten Zeiträumen während der S-Phase radioaktiv markiert wurden, zeigte Hsu (1964), daß in Metaphasenchromosomen, die nach einer Markierung spät in der S-Phase fixiert worden waren, hauptsächlich die zentromeren Regionen der Chromosomen markiert waren.

Daß ein gegebenes Replikationsschema mit DNA-Komplexen, die durch den Zeitpunkt ihrer Replikation identifiziert worden sind, auch von Zellgeneration zu Zellgeneration weitergegeben wird, zeigten Mueller und Kajiwara (1966) mit früh und spät replizierenden DNA-Komplexen in HeLa-Zellen, die über Zellgenerationen zu verfolgen waren. So setzten sie in synchronisierten Zellen einen zeitlich begrenzten ^{3}H-Thymidin-Label, z.B. früh in der S-Phase. Dann überließen sie die Zellen einige Generationen lang einem zufälligen Wachstum, resynchronisierten sie und markierten sie in dem gleichen Zeitintervall in der S-Phase mit 5-Bromdesoxyuridin. Da der anstelle des Thymidins erfolgte Einbau von 5-Bromdesoxyuridin die DNA schwerer machte, konnte die in diesem Zeitintervall synthetisierte DNA auf CsCl-Dichtegradienten abgetrennt werden. Das Radioaktivitätsprofil zeigte dann, daß die Radioaktivität der ^{3}H-Thymidin-Markierung fast ausschließlich in dem 5-Bromdesoxyuridin enthaltenden, schwereren DNA-Bereich zu finden war. Dies deutet eine Replikation der markierten DNA-Komplexe in dem gleichen Zeitraum an.

Die DNA im Genom der Zellen höherer Organismen ist hinsichtlich ihrer Basenzusammensetzung heterogen (Schildkraut und Maio, 1969). Mit Hilfe von präperativen CsCl-Dichtegradienten besteht daher die Möglichkeit, DNA-Moleküle mit unterschied-

lichen physikalischen Eigenschaften hinsichtlich ihres Replikationszeitpunktes zu untersuchen, da der G+C-Gehalt eines DNA-Moleküls direkt verantwortlich ist für die Schwebedichte des betreffenden Moleküls. Unter diesem Gesichtspunkt markierten Tobia et al. (1970) synchronisierte HeLa- bzw. Maus-L-Zellen in Intervallen über die Dauer der DNA-Synthese-Periode mit radioaktivem Thymidin, isolierten die DNA und fraktionierten sie mittels präperativer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in Moleküle mit unterschiedlicher Schwebedichte. Dabei zeigte sich, daß früh in der S-Phase die DNA-Spezies mit höheren Schwebedichten die höchste spezifische Radioaktivität aufwiesen. Sie zeigten weiter, daß mit dem Fortschreiten der DNA-Synthese-Periode in zunehmendem Maße DNA-Moleküle mit niedrigerer Schwebedichte repliziert wurden und daß gegen Ende der S-Phase die neu replizierten DNA-Moleküle eine geringere Dichte als die schon existierende DNA aufwiesen. Diese Ergebnisse zeigten an, daß früh in der S-Phase DNA-Sequenzen repliziert wurden, die reich an G+C waren, während gegen Ende der S-Phase A+T-reiche Sequenzen von der Replikation erfaßt wurden. Diese Befunde wurden von Flamm (1971) und von Bostock und Prescott (1971) für synchronisierte Maus-L-Zellen bestätigt.

Diese Ergebnisse legten die mögliche Interpretation nahe, daß der zeitliche Ablauf der Replikation von der unterschiedlichen Basenzusammensetzung der Replikationseinheiten bestimmt wird, wobei G+C angereicherte Sequenzen eine Replikation in der frühen S-Phase signalisieren, während in A+T reichen Replicons die Initiation der Replikation in der späten S-Phase stattfindet.

Diese Hypothese konnte weiter überprüft werden durch die Untersuchung des Replikationszeitpunktes einer für das Genom höherer Organismen charakteristischen Gruppe von DNA-Sequenzen, der Satelliten-DNA, die aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften von der restlichen DNA abtrennbar ist. Die Satelliten-DNA besteht aus einer Gruppe von redundanten und somit leicht re-assoziierenden Nukleotidsequenzen, die einen beträchtlichen Teil des Genoms ausmachen können. Die Abhän-

gigkeit des Synthesemusters von der Basenzusammensetzung auch für Satelliten-DNA konnte zunächst einmal für die leichte Maus-Satelliten-DNA, die etwa 10% der gesamten Kern-DNA ausmacht, bestätigt werden (Tobia et al., 1970; Flamm et al., 1971; Bostock und Prescott, 1971). Pulse-Markierungsexperimente, die sich über die Dauer der S-Phase synchronisierter Zellen erstreckten, ergaben, daß die Maus-Satelliten-DNA, wie aufgrund ihres hohen A+T-Gehaltes zu erwarten war, spät in der S-Phase repliziert wurde.

In Frage gestellt wurde die obige Interpretation allerdings unter anderem durch den Replikationszeitpunkt der ⊥-Komponente der African Green Monkey-DNA, einer schnell re-assoziierenden, repetitiven DNA-Komponente, die 20% der gesamten Kern-DNA ausmacht. Sie hat die gleiche Schwimmdichte und somit den gleichen G+C-Gehalt wie die restliche DNA, wird aber auch spät in der S-Phase repliziert (Tobia et al., 1972). Weiterhin werden die schweren Satelliten-DNA-Banden der Kangaroo Ratte, die bis zu 60% der gesamten Kern-DNA ausmachen, trotz ihres hohen G+C-Gehaltes spät in der S-Phase repliziert. Dies wurde von Bostock et al. (1972) gezeigt, die einheitlich mit ^{32}P markierte Zellen über die Dauer der S-Phase mit ^{3}H-Thymidin pulse-markierten und nach der Fraktionierung der isolierten DNA auf CsCl-Dichtegradienten das $^{3}H/^{32}P$-Verhältnis zu verschiedenen Zeitpunkten der S-Phase bestimmten.

Diese Ergebnisse führten zu der von Tobia et al. (1972) aufgestellten These, daß die zeitliche Regulation der Synthese von hoch reiterierten Sequenzen, wie sie charakteristisch für Satelliten-DNA und andere homogene DNA-Sequenzen sind, einem anderen Kontrollmechanismus als die Haupt-DNA-Sequenzen unterliegen. Es wurde weiterhin postuliert, daß die Nukleotidsequenzorganisation einiger DNA-Fraktionen und nicht die Basenzusammensetzung die primäre Determinante für ihren Synthesezeitpunkt sein könnte.

Die Organisationsform spielt möglicherweise insoweit eine Rolle, wie auch durch den zeitlich ziemlich eingrenzbaren Verlauf der Replikation der Satelliten-DNA angedeutet wird, daß durch das Hintereinanderschalten vielfacher Kopien be-

stimmter DNA-Sequenzen auf einem Chromosomenabschnitt eine synchrone Replikation dieser Sequenzen zu einem bestimmten Zeitpunkt vorstellbar ist. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß die Maus-Satelliten-DNA in den zentromeren Regionen aller Chromosomen lokalisiert ist (Jones, 1970; Pardue und Gall, 1970).

Neben der Organisationsform bestimmter DNA-Abschnitte könnte aber auch die biologische Funktion von DNA-Abschnitten für eine Einordnung in ein gewisses Replikationsschema und für den Replikationszeitpunkt bedeutungsvoll sein. Dies scheint auch von der Seite her berechtigt, indem der Kreis zu den ersten Befunden geschlossen werden kann, daß eine weitere Gemeinsamkeit der verschiedenen Satelliten-DNAs, die auch ihren gemeinsamen Replikationszeitpunkt erklären könnte, in ihrem Vorkommen in den heterochromatischen DNA-Bezirken liegt (Yasmineh und Yunis, 1970). Bestätigt werden konnte dies auch durch die Arbeit von Bostock et al. (s.o.), die neben der späten Replikation der Satelliten-DNA-Banden der Kangaroo Ratte durch autoradiographische Untersuchungen zeigen konnten, daß einmal die Regionen um das Kinetochor der Chromosomen aus Satelliten-DNA zusammengesetzt sind und daß weiterhin das Heterochromatinmuster der Metaphasenchromosomen mit dem Markierungsmuster der zweiten Hälfte der S-Phase identisch ist. Diese Befunde legten den Schluß nahe, daß die Satelliten-DNA nicht zufällig auf dem Chromosom verteilt vorliegt und daß sie verantwortlich ist für das Heterochromatinmuster der Metaphasenchromosomen. Die Bedeutung des sogenannten Heterochromatins allerdings ist erst in Ansätzen erfaßt, so daß Schlußfolgerungen aus dem Replikationszeitpunkt schwer gezogen werden können.

Die Möglichkeit den Replikationszeitpunkt für bestimmte DNA-Abschnitte, die z.B. für spezifische Genprodukte codieren, zu untersuchen, wurde dadurch geschaffen, daß Methoden gefunden wurden, die die Identifizierung bestimmter Gene bzw. Gengruppen innerhalb des Genoms höherer Organismen möglich machten. Grundlage dazu waren Hybridisierungstechniken mit einer für das in Frage kommende Gen spezifischen radioaktiven

hybridisierenden Nukleinsäure (Hybridisierungsprobe). Im Fall der ribosomalen Gene, die als erste hinsichtlich ihres Replikationszeitpunktes untersucht wurden, konnte durch radioaktive Markierung der in der Zelle in großer Menge vorhandenen und in reiner Form darstellbaren ribosomalen RNA-Spezies sehr leicht eine Hybridisierungsprobe hergestellt werden. Weiterhin konnte durch Markierung eines in-vitro hergestellten komplementären RNA-Transcripts der ribosomalen Gene, die infolge ihres hohen Reiterationsgrades mit Hilfe physikalischer Methoden und in den letzten Jahren durch Clonisrungstechniken isoliert werden konnten, ebenfalls eine Hybridisierungsprobe bereitgestellt werden.

Für die Bestimmung des Zeitpunktes der Replikation der ribosomalen Gene in synchronisierten Chinese Hamster-Zellen - einer Gengruppe, die im Chinese Hamster-Genom in etwa 300 Kopien in geclusterter Organisationsform vorliegt - verwendete Stambrook (1974) als Hybridisierungsprobe eine in-vitro präperierte und radioaktiv markierte komplementäre RNA (cRNA) von gereinigter ribosomaler Xenopus laevis-DNA. Die Sequenzhomologie der ribosomalen RNA von Xenopus und von Hamster erwies sich als ausreichend, um die Xenopus cRNA als Hybridisierungsprobe zu benutzen. Stambrook inkubierte dann die synchronisierten Zellen mit 5-Bromdesoxyuridin (BrdUrd) in aufeinanderfolgenden zwei-Stunden-Intervallen während der S-Phase, um in der neu replizierten DNA eine Dichte-Markierung zu setzen. Sie konnte dann durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation von der restlichen DNA abgetrennt werden. Der Anteil der ribosomalen Gene, der während eines jeden Zeitraums repliziert wurde, wurde wiedergegeben durch den Anteil an radioaktiver RNA, die in dem schwereren, BrdUrd enthaltenden DNA-Bereich hybridisierte. Dabei zeigte sich, daß die ribosomale Genreplikation früh in der S-Phase vonstatten geht. Nach Ablauf der ersten beiden Stunden der S-Phase waren bereits 50% der ribosomalen Gene repliziert, während im Verlauf der 4. bis 6. Stunde nur noch 14% dieser Gene verdoppelt wurden.

Bei dem Versuch, den Replikationszeitpunkt für die gleiche Gengruppe in synchronisierten HeLa-Zellen unter Verwendung von homologer radioaktiv markierter 28S RNA als Hybridisierungsprobe zu bestimmen, zeigten Balazs und Schildkraut (1971) allerdings, daß die ribosomalen Gene während der ganzen S-Phase repliziert werden.

Eine Erklärungsmöglichkeit für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist die unterschiedliche chromosomale Verteilung dieser Gengruppen im Chinese Hamster und in der HeLa-Zelle. Während die ribosomalen RNA-Gene in HeLa-Zellen auf mehr als einem Chromosomenpaar verteilt vorliegen (Huberman und Attardi, 1967), liegen die ribosomalen Gene des Chinese Hamsters nur auf einem Chromosom (Hsu et al., 1967). Eine unabhängige Initiation der ribosomalen Genreplikation auf jedem Chromosom zu unterschiedlichen Zeiten, könnte dann zu einem kontinuierlichen Synthesemuster führen, während die Lokalisierung der ribosomalen Gencluster auf einem Chromosom auch die aufgrund der Organisationsform mögliche zeitliche Einengung der Replikation ergibt. Allerdings haben die Ergebnisse mit den verschiedenen Satelliten-DNAs gezeigt, daß die Zelle durchaus in der Lage ist, den Replikationszeitpunkt bestimmter DNA-Abschnitte, auch wenn sie auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, zu synchronisieren.

Dies wurde weiterhin noch bestätigt durch die Arbeiten von Ho und Armentrout (1978), die den Replikationszeitpunkt der 5S RNA-Gene in synchronisierten HeLa-Zellen gerade hinsichtlich der Bedeutung der chromosomalen Verteilung dieser Gene untersuchten. Obwohl die Wahl von drei-stündigen BrdUrd-Markierungsintervallen nur eine relativ grobe Auflösung der S-Phase möglich machte, zeigten sie mit jodierter homologer 5S RNA als Hybridisierungsprobe, daß die Replikation der 5S Gene früh in der S-Phase vonstatten geht. Da die 5S Gene aber über alle Chromosomen verteilt vorliegen (Aloni et al., 1971), erscheint die Bedeutung der chromosomalen Verteilung für eine koordinierte Replikation bestimmter DNA-Abschnitte doch fraglich.

Diese zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse mit den unterschiedlichen Interpretationsmöglichkeiten waren Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit, mit der versucht werden sollte, den Replikationszeitpunkt für eine andere Gengruppe, nämlich die der Histone, im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung physikalischer Eigenschaften, der chromosomalen Verteilung und der Organisationsform der Histongene zu bestimmen.

Die Aufklärung der Organisationsform der Histongene gelang in einem speziell günstigen biologischen System in Form der frühen Seeigelentwicklung. Während dieser Entwicklungsperiode werden durch die hohen Zellteilungsraten verbunden mit der damit erforderlichen DNA-Synthese hohe Histonsyntheseraten erreicht. Die Histon mRNA läßt sich in den frühen Teilungsstadien der Seeigelembryonen daher leicht radioaktiv markieren (Kedes und Gross, 1969). Mit Hilfe dieser radioaktiven RNA konnten Kedes und Birnstiel (1971) zeigen, daß die Histongene im Seeigelgenom in mehreren Hundert Kopien vorkommen und hintereinandergeschaltet sind. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen und molekularen Clonierungstechniken konnten die Histon-spezifischen DNA-Sequenzen verschiedener Seeigel-Spezies durch Hybridisierung gegen die spezifischen mRNAs isoliert werden (Kedes et al., 1975a). Die Hybridisierung dieser DNA gegen die gereinigten individuellen mRNAs ergab, daß die Strukturgene für alle fünf Histone gemeinsam auf einer Repeat-Einheit liegen und durch Spacer-DNA voneinander getrennt sind (Kedes et al., 1975b; Schaffner et al., 1976). Mit Restriktionsanalysen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte eine für die untersuchten Seeigel-Spezies gleiche Anordnung der Histon-codierenden Sequenzen innerhalb einer Repeat-Einheit wie folgt beschrieben werden:

3'-Ende . . . - H1 - H4 - H2B - H3 - H2A - . . . 5'-Ende

Die Sequenzierung dieser clonierten Histon-DNAs (Sures et al., 1976; Birnstiel et al., 1977; Schaffner et al., 1978; Sures et al., 1978) ergab, daß die mRNA-codierenden

Regionen colinear mit der Aminosäurefrequenz der betreffenden Histone verlaufen und somit keine intervenierenden Sequenzen innerhalb der Strukturgene vorhanden sind. Die Histongene weisen innerhalb der Repeat-Einheit die gleiche Polarität auf, womit ein Strang für die Synthese aller fünf mRNAs codiert. Die Basenzusammensetzung der codierenden Regionen liegt bei 55% G+C, während die Spacer-Regionen 58 bis 68% A+T aufweisen.

Von Cohen et al. (1975) und von Brandt et al. (1979) wurde gezeigt, daß im Laufe der frühen Seeigelentwicklung elektrophoretisch unterscheidbare Proteine der Histone H2A, H2B und H1 auftreten. Für sie codieren auch unterschiedliche stadiumsspezifische mRNAs (Newrock et al., 1978; Arceci et al., 1976). Durch Schmelzkurvenanalysen mit diesen stadiumsspezifischen mRNAs konnte nachgewiesen werden (Kunkel und Weinberg, 1978), daß die bis jetzt klonierten Seeigelhistongene nur für die im Laufe der Entwicklung zuerst auftretenden Histonproteine codieren. Es bestehen also verschiedene Histongen-Repeat-Einheiten, die für die Synthese der im Laufe der Seeigelentwicklung unterschiedlichen Histonproteine verantwortlich sind und die unterschiedlich reguliert werden. Die Variabilität der Histonproteine ist somit Ausdruck einer qualitativ unterschiedlichen genetischen Aktivität der Zellen während des Lebenszyklus der Seeigel.

Neben dem Auftreten dieser entwicklungsbedingten Heterogenität der Histongene zeigten die Befunde von Gross et al. (1976) und von Grunstein et al. (1976), daß auch innerhalb eines Entwicklungsstadiums strukturelle Unterschiede aller fünf Histon mRNAs auftreten. Das bedeutet, daß neben einem entwicklungsbedingten unterschiedlichen Aktivitätszustand verschiedener Histongenklassen auch in jedem Entwicklungsstadium selbst verschiedene Klassen parallel aktiv sind. Das Bild der Heterogenität der Seeigel-Histongene wurde noch abgerundet durch die Ergebnisse von Overton und Weinberg (1978), die für die Histongen-Repeat-Einheiten sowohl Längen- als auch Sequenzheterogenität

feststellen konnten. Diese Autoren konnten weiterhin beträchtliche Strukturunterschiede bei einzelnen Histongen-Repeat-Einheiten zwischen verschiedenen Individuen einer Seeigel-Spezies zeigen.

Neben der Beschreibung der Organisation der Seeigel-Histongene stehen bis jetzt weitere detailliertere Ergebnisse hinsichtlich der Organisationsform der Histongene nur für Drosophila melanogaster zur Verfügung (Lifton et al., 1977). In mehreren Punkten konnten hier Ähnlichkeiten mit der Organisationsform von Seeigeln festgestellt werden. Auch bei Drosophila sind die Histongene in Form von sich wiederholenden Einheiten hintereinandergeschaltet ("geclustert"), in denen jedes Strukturgen einmal vorkommt. Die einzelnen Histongene sind wie bei den Seeigeln durch Spacer-DNA voneinander getrennt. Allerdings ergab die Analyse einer clonierten Repeat-Einheit einen bedeutenden topologischen Unterschied in der Organisationsform, nämlich eine alternative Anordnung der Gene auf den entgegengesetzten DNA-Strängen in folgender Art:

5'-Ende . . . -- H2B ---- H4 -- . . . 3'-Ende
3'-Ende . -- H1 ---- H2A ---- H3 -- . 5'-Ende

Die Clonierung der Drosophila-Histongene ergab weiterhin, daß zwei Haupttypen an Repeat-Einheiten existierten. Diese beiden Repeat-Einheiten sind 4,75 bzw. 5,0 kb lang und unterscheiden sich nur in einer 250 bp langen Insertion für die längere Repeat-Einheit, die sich in der Spacer-DNA zwischen den Strukturgenen für die Histone H1 und H3 befindet. Durch Hybridisierung von nick-translatierter DNA (Rigby et al., 1977) von diesen beiden Repeat-Einheiten gegen mit Restriktionsenzymen verdaute Gesamt-DNA zeigte sich, daß die längere Repeat-Einheit in einem Verhältnis von 4:1 im Genom vorherrscht. Die einzelnen Repeat-Einheiten liegen ebenfalls hintereinandergeschaltet auf einem Chromosom und sind etwa 110-fach pro haploidem Genom reiteriert.

Auch in Drosophila besteht eine Heterogenität der Histongene (beschrieben bei Kedes, 1979). Neben den beiden beschriebenen Haupttypen sind noch selten vorkommendere

Repeat-Einheiten cloniert worden. Diese Clone enthalten zusätzliche Sequenzen innerhalb der Spacer-DNA. Es ist bemerkenswert, daß diese DNA-Sequenzen nicht nur innerhalb der Histongen-Repeat-Einheiten gefunden wurden, sondern über das gesamte Genom verteilt nachweisbar sind. Die biologische Bedeutung der Heterogenität der Histongene ist unbekannt.

In situ-Hybridisierungen an Riesenchromosomen ergaben, daß die Histongene von Drosophila in der Region 39 D-E auf dem linken Arm des Chromosoms 2 lokalisiert sind (Pardue et al., 1972). Auch für die menschlichen Histongene, die etwa 30 bis 40-fach pro haploidem Genom reiteriert sind (Wilson und Melli, 1977; Wilson et al., 1974), deuten in situ-Hybridisierungen darauf hin, daß diese Gene einem einzigen Chromosom, nämlich dem distalen Ende des längeren Arms des Chromosoms 7 zugeordnet werden können (Yu et al., 1978). Daraus könnte die Schlußfolgerung gezogen werden, daß auch hier hintereinandergeschaltete Repeat-Einheiten vorliegen. Das Replikationsmuster der menschlichen Histongene könnte dadurch bestimmt werden. Die Untersuchungen zum Reiterationsgrad und der Lokalisation der menschlichen Histongene wurden allerdings mit heterologen Hybridisierungsproben bzw. mit nur partiell gereinigter Histon mRNA gemacht, wodurch diese Ergebnisse nur vorläufigen Charakter haben. Endgültige Aussagen über die Organisationsform der menschlichen Histongene und deren chromosomaler Verteilung werden erst dann möglich sein, wenn diese Gene cloniert worden sind und für in situ-Hybridisierungen eingesetzt werden können.

Dem Replikationszeitpunkt der Histongene könnte besondere Bedeutung zukommen durch einen möglichen regulatorischen Einfluß auf die Histonsynthese selbst. Wie schon seit längerer Zeit bekannt ist (Spalding et al., 1966; Robbins und Borun, 1967) und wie auch von Wilkes et al. (1978) durch in situ-Hybridisierungen von Seeigel-Histon-DNA-Sequenzen im Cytoplasma unsynchronisierter Populationen verschiedener Zell-Linien bestätigt wurde, besteht in eukaryonten Zellen

eine enge Beziehung zwischen DNA- und Histonsynthese. Die Histonsynthese läuft ausschließlich während der S-Phase des Zellzyklus ab und eine Unterbrechung der DNA-Replikation durch Cytosinarabinosid oder Hydroxyharnstoff führt zu einem abrupten Abfall der Histonsyntheserate (Borun et al., 1967; Gallwitz und Mueller, 1969; Jacobs-Lorena et al., 1972). Die Unterbrechung der Histonsynthese geht einher mit einem Verlust von radioaktiv markierter bzw. translatierbarer cytoplasmatischer Histon-mRNA (Robbins und Borun, 1967; Gallwitz und Mueller, 1969 und 1970; Gallwitz, 1975). Diese und andere Untersuchungen zeigten, daß die Histonsynthese innerhalb der S-Phase des Zellzyklus auf der Ebene der Transcription durch Bereitstellung von Histon-mRNA reguliert wird. Der Abfall der mRNA-Aktivität nach Ablauf oder Unterbrechung der S-Phase dagegen beruht auf einer raschen Inaktivierung oder Änderung der Turnover-Rate dieser mRNAs. Befunde von Breindl und Gallwitz (1973) zeigten, daß neu-synthetisierte Histon-mRNA mit einem Maximum in den ersten zwei bis drei Stunden der S-Phase in das Cytoplasma gelangt. Das ist in Einklang mit Untersuchungen von Perry und Kelly (1973), die für die Histon-mRNAs in Kulturzellen eine Lebenszeit von etwa zehn Stunden bestimmten, was der Länge einer S-Phase entspricht. Dagegen fanden Melli et al. (1977) in Hybridisierungsexperimenten mit Seeigel-Histongen-DNA, daß die Histon-mRNA-Synthese möglicherweise während des gesamten Zellzyklus vonstatten geht.

Dem Replikationszeitpunkt der Histongene könnte insoweit eine Bedeutung zukommen, daß durch einen sehr frühen Zeitpunkt der Replikation eine Art Gendosiseffekt erreicht würde, womit weitere Matrizen für die Transcription zur Verfügung gestellt werden könnten, die eine dem großen Bedarf entsprechende Histonsynthese innerhalb der S-Phase gewährleisten. Damit würde dem Replikationszeitpunkt eines Genes eine gewisse regulatorische Funktion zukommen. Andererseits ist es unwahrscheinlich, daß während maximaler Transcription der Histongene in den ersten Stunden der S-Phase ein signifikanter Teil dieser Gene gleichzeitig repliziert wird. Wir vermuteten deshalb, daß die Replikation der Histongene in der späten S-Phase stattfindet.

Die vorliegende Arbeit beschreibt Untersuchungen zum Replikationszeitpunkt der Histongene während der S-Phase von HeLa-Zellen. Diese Arbeiten wurden durchgeführt, um Einblick in die mögliche chromosomale Verteilung bestimmter DNA-Abschnitte, die Organisationsform dieser DNA-Abschnitte und eine eventuelle regulatorische Funktion der Histongenreduplikation bei der Bereitstellung von Histon-mRNA während der S-Phase des Zellzyklus zu erhalten. Weiterhin wurde versucht durch Hybridisierungen von mit Restriktionsenzymen verdauter Gesamt-HeLa-DNA gegen Seeigel-Histongen-cRNA weitere Aussagen über die Organisationsform der Histongene in HeLa-Zellen machen zu können.

Die Untersuchungen über die Replikation der Histongene in HeLa-Zellen haben gezeigt, daß diese sich über die Dauer der gesamten S-Phase erstreckt. Das Maximum der Histongenreplikation liegt jedoch vor dem der gesamten DNA-Synthese.

Die Hybridisierungen von restriktionsverdauter Gesamt-HeLa-DNA gegen eine ^{32}P-markierte cRNA von einer gesamten Seeigel-Histongen-Repeat-Einheit bzw. von einem einzigen Histongen (H4) zeigen mehrere gemeinsam auftretenden Hybridisierungsbanden, die auch in HeLa-Zellen auf eine geclusterte Organisationsform der Histongene hinzudeuten scheinen.

II. Material und Methoden

2.1. Material

(Methyl-^{14}C) Thymidin (spez. Akt. 61,5 mCi/mmol) wurde von New England Nuclear (NEN, Dreieichenhain) bezogen.

Das Radiochemical Center (Amersham) lieferte α-^{32}P-GTP (spez. Akt. 350,0 Ci/mmol).

Weiterhin wurden bezogen:
Nukleosidtriphosphate, Ribonuklease A (Rinderpankreas), Proteinase K, Lysozym, DNAase I, E.coli tRNA und die Restriktionsenzyme Eco R1 (10000 Einheiten/150 µl), Hind III (1000 Einheiten/34 µl) und Pst I (300 Einheiten/100 µl) von Boehringer (Mannheim).

Die Firma Miles lieferte die Restriktionsenzyme Eco R1 (7500 Einheiten/63 µl), Hind III (500 Einheiten/91 µl) und Bam I (500 Einheiten/60 µl) und Lambda-DNA.

Hydroxyharnstoff, 5-Bromdesoxyuridin, Ethidiumbromid und Agarose Typ II Medium EEO wurde von der Firma Sigma (München) bezogen.

Sephadex G50 lieferte die Firma Pharmacia (Uppsala), Nitrocellulose-Filter (BA 85, Porengröße 0,45 µm, Durchmesser 23 und 293 mm) die Firma Schleicher & Schuell (Dassel).

Die Chemikalien für die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Amberlite MB 1 wurden von Serva (Heidelberg) geliefert.

Alle übrigen Chemikalien wurden in p.a. Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Die E.coli RNA-Polymerase war ein Geschenk von G. Schütz (Berlin).

Die menschliche Placenta-DNA war ein Geschenk von H. Blin (Berlin).

Die Plasmide psp 2 und 17 wurden uns freundlicherweise von L. Kedes (San Franzisco), das Plasmid pCO2 von E.S. Weinberg (San Franzisco) und das Plasmid pTS 306 von M. Birnstiel (Zürich) überlassen.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellwachstum und Synchronisierung

A. Reagenzien

Hydroxyharnstoff: 0,3 M (steril)

B. Durchführung

HeLa S3-Zellen wurden in Suspensionskultur in Eagle's Minimum Essential Medium, das 5% Kälberserum enthielt, aufgezogen. Die Zellzahl lag zwischen 2 und 6 x 10^5 Zellen/ml. Die Synchronisierung der logarithmisch wachsenden Zellen wurde erreicht durch Inhibierung der Ribonukleotidreduktase und damit verbunden einer Blockierung der DNA-Synthese infolge eines Mangels an Vorstufen durch Hydroxyharnstoff (Adams und Lindsay, 1967; Breindl und Gallwitz, 1974). Dazu wurden die logarithmisch wachsenden Zellen auf eine für eine optimale Synchronisierung erforderliche Ausgangszellkonzentration von 1,5 bis 2,0 x 10^5 Zellen/ml verdünnt. 3 l dieser Zellen wurden dann bei 37°C in Anwesenheit von 1,5 mM Hydroxyharnstoff für zwei 15-Stunden-Intervalle inkubiert. Diese Intervalle wurden unterbrochen von einer 10-stündigen DNA-Synthese-Periode in Abwesenheit von Hydroxyharnstoff. Der Hydroxyharnstoff wurde nach jedem 15-Stunden-Intervall durch Zentrifugation bei 800g für 10 min und Aufnahme des Zellpellets in frischem und angewärmtem Medium (37°C) entfernt. Die Glassachen, das Medium und die Zentrifugen waren bei allen Schritten angewärmt.

2.2.2. Markierung von HeLa-Zellen mit 5-Bromdesoxyuridin

A. Reagenzien

5-Bromdesoxyuridin (BrdUrd): 1 mM in Wasser (steril)

B. Durchführung

Die Zellen wurden nach dem Entlassen aus dem Doppelblock in 2,2 l frischem Medium aufgenommen. Die Zellzahl lag bei 3,8 bis 4,4 x 10^5 Zellen/ml. Diese 2,2 l wurden in elf 200 ml-Kulturen aufgeteilt. Die Zellen wurden dann durch

Zugabe von 2 ml der 5-Bromdesoxyuridinlösung in einer Endkonzentration von 10 µM für aufeinanderfolgende 1-Stunden-Intervalle, die die Dauer der S-Phase umfaßten, markiert. Um sicher zu gehen, daß auch die gesamte S-Phase mit der Markierung erfaßt wurde, wurden zehn Teilkulturen nacheinander eine Stunde lang markiert. Die elfte Teilkultur diente als Kontrolle, um zu zeigen, daß die Zellen auch nach einer längeren Einwirkung von Hydroxyharnstoff noch in der Lage waren, den Zellzyklus weiter zu durchlaufen. Der Einlauf in die Mitose-Phase wurde mikroskopisch durch Bestimmung der Zellzahl überprüft. Nach Ablauf der 1-Stunden-Intervalle erfolgte die weitere Aufarbeitung der Zellen zur DNA-Isolierung.

2.2.3. Markierung von HeLa-Zellen mit ^{14}C-Thymidin

A. Reagenzien

Trichloressigsäure: 10% (w/v) in Wasser

B. Durchführung

Die Kinetik der DNA-Synthese im Verlauf der S-Phase wurde verfolgt durch Messung des Einbaues von ^{14}C-Thymidin in säurefällbares Material. Die Zeitpunkte der Probenentnahme lagen zu Beginn der 1-Stunden-Markierungs-Intervalle mit 5-Bromdesoxyuridin. Dazu wurden je 3 ml von den 200 ml-Teilkulturen mit 1 µCi ^{14}C-Thymidin versetzt, für 15 min bei 37°C geschüttelt und dann mit 6 ml eiskalter TCA-Lösung präzipitiert. Das säurefällbare Material wurde abzentrifugiert, die Pellets durch Resuspendierung mit anschließendem Abzentrifugieren noch zweimal in kalter 10%iger TCA-Lösung, einmal in Äthanol/Äther (1/1, v/v) und einmal in Äther gewaschen und getrocknet. Die gut getrockneten Pellets wurden mit je 1,5 ml Ameisensäure bei 37°C über mehrere Stunden hydrolysiert. Anschließend wurden je 0,5 ml der Proben in Bray's Szintillationsflüssigkeit (Bray, 1960) gezählt. Der Einbau des ^{14}C-Thymidins wurde bei jeder Probenentnahme in voneinander unabhängigen Duplikaten bestimmt.

2.2.4. Isolierung von DNA aus HeLa-Zellen

A. Reagenzien

Alle Puffer waren steril

Waschpuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5
0,5 M NaCl

Lysispuffer: 0,15 M NaCl
0,1 M EDTA
0,5% SDS pH 8,0

Proteinase K: 20 mg/ml in Wasser

Natriumperchlorat: 5 M in Wasser

Chloroform-Isoamylalkohol: 24:1 (v/v)

Aufnahmepuffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,0
10 mM EDTA

RNAase A: 2 mg/ml in Wasser
die Lösung wurde für 2-3 min bei 80°C im Wasserbad erhitzt, um kontaminierende DNAase zu entfernen

SDS-Lösung: 10% in Wasser

Gradientenpuffer: 10 mM Na-Boratlösung pH 9,2

B. Durchführung

Die HeLa-Zellen wurden nach der Synchronisierung und gegebenenfalls nach Markierung mit 5-Bromdesoxyuridin in der Kälte bei 2000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in kaltem Waschpuffer wurde das Pellet in 5 ml des Lysispuffers suspendiert. Dieser Schritt erfolgte bei Zimmertemperatur. Nach Zugabe von 50 µl der Proteinase K-Lösung (200 µg Proteinase K/ml Lysat) wurde das Lysat für 90 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Um das Abdissoziieren der Proteine zu erleichtern, wurde anschließend Na-Perchlorat bis zu einer Endkonzentration von 1 M hinzugegeben. Das Lysat wurde dann für 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt, woran sich eine Extraktion mit dem gleichen Volumen an Chloroform-Isoamylalkohol anschloß. Dazu wurde das Gemisch für 20 min intensiv geschüttelt, bei 10000 rpm für 10 min abzentrifugiert, Wasser- und Interphase gemeinsam aufgenommen und einer erneuten Extraktion unterworfen. Nach der zweiten Zentrifugation wurde die Wasser-

phase allein abgehoben, mit zwei Volumina Äthanol überschichtet und die DNA, die zwischen den beiden Schichten ausfiel, um einen sterilen Glasstab gewickelt. Die DNA wurde für einige Minuten getrocknet, in 5 ml des Aufnahmepuffers aufgenommen und in der Kälte gelöst.

Daran schloß sich eine RNA-Verdauung mit 125 µl der RNAase A-Lösung (50 µg RNAase A/ml Lösung) über 30 min im Wasserbad an. Die Reaktion wurde abgebrochen, indem die Lösung auf eine Endkonzentration von 0,5% SDS gebracht wurde. Um eine weitere Deproteinisierung zu erreichen, wurde noch einmal mit Proteinase K unter den gleichen Bedingungen verdaut, woran sich eine dreimalige Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion anschloß. Nach der letzten Zentrifugation wurde die Wasserphase abgehoben und mit zwei Volumina Äthanol überschichtet. Die zwischen den Phasen ausfallende DNA wurde um einen Glasstab gewickelt, getrocknet und in 4 ml des Gradientenpuffers aufgenommen. Nach dem vollständigen Lösen der DNA in der Kälte wurde die Absorption bei 260 nm bestimmt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und derjenigen bei 280 nm gab Auskunft über eine eventuell vorliegende Verunreinigung mit Protein.

2.2.5. Größenbestimmung von mit 5-Bromdesoxyuridin-markierter HeLa- und von menschlicher Placenta-DNA

A. Reagenzien

Na-Acetat: 3 M in Wasser pH 6,5

Aufnahmepuffer: 0,1 M NaCl
0,01 M EDTA
0,1 M NaOH

alkalische Gradientenlösung: 15 und 30% Sucrose in
0,1 M NaCl
0,01 M EDTA
0,1 M NaOH

neutrale Gradientenlösung: 15 und 30% Sucrose (w/v) in
0,1 M NaCl
0,01 M EDTA
50 mM Tris-HCl pH 7,6

B. Durchführung

Von den mit 5-Bromdesoxyuridin markierten HeLa-DNA-Proben wurden jeweils 2,5 A_{260}-Einheiten und von der menschlichen Placenta-DNA 4 A_{260}-Einheiten mit 1/10 vol 3 M Na-Acetat und 2,5 vol Äthanol über Nacht gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Pellets in je 200 µl des Aufnahmepuffers gelöst. Diese 200 µl wurden auf 11 ml eines 15-30%igen alkalischen Sucrose-Gradienten geschichtet und bei 2°C für 22 Stunden bei 25000 rpm in einem Beckman SW41-Rotor zentrifugiert. Die Gradienten wurden dann durch eine Durchflußküvette eines Spektralphotometers gepumpt und die Absorption bei 260 nm bestimmt. Zum Vergleich wurden auf einem neutralen 15-30%igen Sucrosegradienten unter den gleichen Bedingungen je 2,5 A_{260}-Einheiten von 4S, 18S und 28S RNA aus HeLa-Zellen zentrifugiert.

2.2.6. Fraktionierung von DNA auf CsCl-Dichtegradienten

A. Reagenzien

Na-Boratlösung: 0,01 M pH 9,2 (steril)
CsCl-Stocklösung: 1,4386 g/ml CsCl in 0,01 M Na-Borat
4 x SSC: 0,6 M NaCl
0,06 M Na-Citrat (steril)

B. Durchführung

Um für die mit 5-Bromdesoxyuridin markierte HeLa-DNA eine gute Trennung zwischen schwerem, das heißt BrdUrd-markiertem und leichterem, unmarkiertem Material zu erreichen, wurden folgende Gradienten gefahren, die auch bei unmarkierter HeLa- und bei Placenta-DNA übernommen wurden:
Auf 7,5 ml der CsCl-Stocklösung kamen 600 µl Auftragsvolumen für die DNA, die in der Na-Boratlösung gelöst vorlag. Bei dem mit BrdUrd markierten Material konnte eine Auftragsmenge von 80 µg nicht überschritten werden, um ein Gradientenbild zu erhalten, das nicht durch hohe und schwankende Hintergrundswerte gestört war. Bei unmarkierter DNA konnten bis zu 200 µg pro Gradient aufgetragen werden. Nach

gutem Vermischen der beiden Komponenten lag in der Lösung ein Refraktionsindex von 1,3990 vor, was nach der Umrechnungsformel: $\rho^{25°C} = 10{,}8601 \times n_D - 13{,}4974$ (ρ = spezifische Dichte, n_D = Refraktionsindex, Schildkraut et al., 1962) einer spezifischen Dichte von 1,696 entsprach. Die Gradienten wurden mit Paraffinöl aufgefüllt, verschlossen und bei 33000 rpm für 65 Stunden bei 25°C in einem Festwinkelrotor zentrifugiert. Die Gradienten wurden fraktioniert, indem sie in eine Apparatur eingespannt wurden, die es ermöglichte, die Gradienten luftdicht abzuschließen, um sie dann von unten mit einer Nadel anstechen zu können. Mit Hilfe einer mit einer Meßskala versehenen Spritze wurden die Gradienten dann so mit Paraffinöl überschichtet, daß Fraktionen bestimmter Größe aus dem Gradienten austropften. Es wurden 29 Fraktionen mit je 0,25 ml gesammelt. Um den Verlauf des Refraktionsindexes zu verfolgen, um die DNA-Peaks einer bestimmten spezifischen Dichte zuordnen zu können, wurde dieser in einigen Fraktionen bestimmt. Anschließend wurden die Fraktionen mit 4 x SSC auf einen ml aufgefüllt und die Absorption bei 260 nm bestimmt.

2.2.7. Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Es standen folgende Plasmide zur Verfügung:

psp 2: E.coli Stamm: K 12, C 600
Plasmid: pSC 101
mit Hilfe des Restriktionsenzyms Eco R1 wurden die Gene für die Histone H1, H2B und H4 aus dem Seeigel Strongylocentrotus purpuratus in das Plasmid insertiert

psp 17: E.coli Stamm: K 12, C 600
Plasmid: pSC 101
mit Hilfe des Restriktionsenzyms Eco R1 wurden die Gene für die Histone H3 und H2A aus dem Seeigel S. purpuratus in das Plasmid insertiert
(Kedes et al., 1975a; Kedes et al., 1975b; Cohn et al., 1976; Wu et al., 1976)

pCO2: E.coli Stamm: K 12, HB 101
Plasmid: pBR 313
mit Hilfe des Restriktionsenzyms Hind III wurden die Gene für die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 aus dem Seeigel S. purpuratus in das Plasmid insertiert (Overton und Weinberg, 1978)

pTS 306: E.coli Stamm: K 12, HB 101
Plasmid: pCR 1
das H4 Histongen aus dem Seeigel Psammechinus miliaris wurde in die Eco R1 Schnittstelle des Plasmids mit der Poly (dT) - Poly (dA)-Methode (Hofstetter et al., 1976) insertiert (persönliche Mitteilung von M.Birnstiel, Zürich)

2.2.7.1. Präperation der Plasmid-DNA

A. Reagenzien

Aufnahmepuffer: 25% Sucrose in 0,05 M Tris-HCl pH 8,0
Lysozym: 20 mg/ml in Wasser
EDTA: 0,25 M pH 8,0
Lysispuffer: 1,5% Triton X-100
62,5 mM EDTA
50 mM Tris-HCl pH 8,0
Ethidiumbromid: 10 mg/ml in Wasser
Isopropylalkohol: gesättigt mit CsCl
Dialysepuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA
Na-Acetat: 3 M in Wasser pH 6,5

B. Durchführung

3 l einer Kultur der jeweiligen E.coli Zellen wurden über Nacht bis zur späten logarithmischen Phase aufgezogen. Die Zellen werden dann bei 3000 rpm für 20 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden von da an im Eisbad behalten. Dort wurden sie in 60 ml des Aufnahmepuffers mit Hilfe einer abgebrochenen Pasteur-Pipette suspendiert. Dann erfolgte unter leichtem Schütteln die tropfenweise Zugabe von 12 ml der Lysozymlösung. Da die verwendeten

E.coli Stämme schwer zu lysieren waren, erfolgte die Lysis für 30 min bei 37°C im Wasserbad. Von diesem Zeitpunkt an war es wichtig so weiterzufahren, daß die 'chromosomale' DNA nicht zu großen Scherkräften ausgesetzt war, da die spätere Trennung von Plasmid- und 'chromosomaler' DNA auf einer möglichst großen Intaktheit der 'chromosomalen' DNA beruhte. Nach Zugabe von 24 ml der EDTA-Lösung wurden anschließend 96 ml des Lysispuffers zugefügt. Um eine vollständige Lysis zu erreichen, wurde die Probe für einige Minuten bei 37°C im Wasserbad belassen. Ein Großteil der 'chromosomalen' DNA wurde dann in einem Beckman SW27-Rotor mit 20000 rpm in 90 min pelletiert, das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde abgemessen und pro ml wurden 800 µg, das entsprach 80 µl, der Ethidiumbromidlösung zugegeben. Da das Ethidiumbromid lichtempfindlich ist, wurde die Lösung von diesem Zeitpunkt an im Dunkeln gehalten. Ethidiumbromid wird als interkalierender Farbstoff von der 'chromosomalen' DNA stärker gebunden als von der Plasmid-DNA. Mit der Aufnahme von Ethidiumbromid ist eine Erniedrigung der Schwimmdichte verbunden. Dies hat zur Folge, daß nach einer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation - unter UV-Licht erkennbar - die schwerere Plasmid-DNA-Bande von der leichteren Bande der 'chromosomalen' DNA abgetrennt wird. Um diese Trennung zu erreichen, wurde die Lösung mit CsCl auf einen Refraktionsindex von 1,3970 bis 1,3980 eingestellt. Die Zentrifugation wurde für mindestens 40 Stunden bei 40 000 rpm und 22°C in einem Festwinkelrotor durchgeführt. Das Sammeln der Plasmid-DNA-Bande erfolgte bei UV-Licht unter den gleichen Bedingungen wie unter 2.6. beschrieben. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde die Probe drei- bis viermal mit dem gleichen Volumen an Isopropylalkohol ausgeschüttelt, bis sie unter UV-Licht einen grünlichen Schimmer aufwies. Dies deutete eine vollständige Entfernung des Farbstoffes an. Die sich anschließende Dialyse erfolgte über wenigstens 24 Stunden mit einem Minimum von drei Pufferwechseln. Die Probe wurde mit 1/10 vol 3 M Na-Acetat und 2,5 vol Äthanol bei -20°C über Nacht gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Pellet in einem möglichst kleinen Volumen des Dialysepuffers aufgenommen und die Absorption bei 260 nm bestimmt.

2.2.7.2. Überprüfung der Reinheit der präperierten Plasmid-DNA durch analytische Agarose-Gele

A. Reagenzien

Tris-Borsäure-EDTA (TBE-)-Puffer: 0,89 M Tris
(10-fach konzentriert) 2,8 mM EDTA
0,89 Borsäure

Agaroselösung: 0,9% Agarose in einfach konzentriertem TBE-Puffer

Elektrophoresepuffer: TBE-Puffer - einfach konzentriert -

Ethidiumbromid: 10 mg/ml in Wasser

Auftragspuffer - zweifach konzentriert -: 10% Glycerin
0,05% Bromphenolblau
0,05% Xylene Cyanole FF

B. Durchführung

Die Agarose-Gele wurden in Form von Platten-Gelen (12cm x 15cm x 0,3cm) gefahren. Zum Lösen der Agarose mußte diese auf 100°C erhitzt werden. Mit der flüssigen Agaroselösung wurden zunächst einmal die Trennstäbe zwischen den Glasplatten abgedichtet. Nach leichtem Abkühlen der Lösung wurde das Gel gegossen. Durch das Einführen eines Kammes entstanden 13 Taschen zum Probenauftragen. Die optimale Auftragsmenge pro Tasche lag zwischen 5 und 10 µl. 1 µg der Probe reichte aus, um sie auf dem Gel sichtbar zu machen. Die Elektrophorese wurde bei 100 bis 150 Volt konstant für 90 bis 120 Minuten durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt. Dazu füllte man eine Glasschale mit etwa 500 ml des Elektrophoresepuffers und gab 200 bis 400 µl der Ethidiumbromidlösung hinzu. In dieser Farbstofflösung wurde das Gel für einige Minuten belassen. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde aus dem Gel wieder entfernt, indem man es wiederum für einige Minuten in eine Glasschale mit bidestilliertem Wasser legte. Unter UV-Licht waren die DNA-Banden dann sichtbar.

2.2.8. Präperative Gewinnung des insertierten Seeigel-Histongen-DNA-Abschnittes aus der Plasmid-DNA

2.2.8.1. Schneiden der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

A. Reagenzien

Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym Eco RI (Miles)
- 10-fach konzentriert -: 1 M Tris-HCl pH 7,5
0,5 M NaCL
0,1 M $MgCl_2$

Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym Eco RI (Boehr.)
- 10-fach konzentriert -: 0,1 Tris-HCl pH 7,5
60 mM $MgCl_2$
0,5 M NaCl
5 mM Dithiothreithol
500 µg/ml Gelatine

Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym Hind III (Miles)
- 10-fach konzentriert -: 60 mM Tris-HCl pH 7,5
60 mM $MgCl_2$
0,5 M NaCl
1 mg/ml Albumin

Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym Hind III (Boehr.)
- 10-fach konzentriert -: 0,1 M Tris-HCl pH 7,6
0,5 M NaCl
0,1 M $MgCl_2$
140 mM Dithiothreithol

Verdünnungspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,6
50 mM NaCL
10 mM $MgCl_2$
14 mM Dithiothreithol

Chloroform-Isoamylalkohol: 24:1 (v/v)

Na-Acetat: 3 M in Wasser pH 6,5 (steril)

B. Durchführung

Die DNA-Abschnitte mit den Gegen für die Histone H1, H4 und H2B bzw. H3 und H2A aus dem Seeigel S. purpuratus, die in den Plasmiden psp 2 bzw. psp 17 insertiert sind, wurden mit Hilfe des Restriktionsenzyms Eco RI aus dem Plasmid herausgeschnitten. Die Reaktionen wurden in möglichst kleinen

Volumina (bis zu 100 µl) in siliconisierten Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Für das Restriktionsenzym Eco RI von Miles wurden von 2 A_{260}-Einheiten 1 µl des unverdünnten Enzyms eingesetzt, während für das gleiche Enzym von Boehringer 1 µl des unverdünnten Enzyms nur für eine A_{260}-Einheit ausreichend war.

Aus dem Plasmid pCO2, das den DNA-Abschnitt für alle fünf Histongene des gleichen Seeigels enthält, wurde dieser Abschnitt mit Hilfe des Restriktionsenzyms Hind III herausgeschnitten. Für das Restriktionsenzym Hind III von Miles waren für eine A_{260}-Einheit 3 µl des unverdünnten Enzyms ausreichend. Das Enzym von Boehringer mußte vor der Anwendung mit dem Verdünnungspuffer 1:10 verdünnt werden. Für eine A_{260}-Einheit wurden dann 5 µl des verdünnten Enzyms eingesetzt.

Die Ansätze enthielten je 10 µl des jeweiligen konzentrierten Reaktionspuffers und die entsprechenden DNA- und Enzymmengen. Mit bidestilliertem Wasser wurde dann auf 100 µl aufgefüllt. Die Reaktionen liefen über zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad ab. Sie wurden unterbrochen durch eine einmalige Extraktion mit dem gleichen Volumen an Chloroform-Isoamylalkohol. Nach der Zentrifugation zur Phasentrennung wurde die obere, wäßrige Schicht vorsichtig abgehoben und mit 1/10 vol Na-Acetat und 2,5 vol Äthanol bei -80°C für zwei Stunden gefällt. Das Pellet wurde nach der Zentrifugation in einem möglichst kleinen Volumen an bidestilliertem Wasser aufgenommen.

2.2.8.2. Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese

Wie schon im Abschnitt 2.7.2. beschrieben, wurden zur Überprüfung, ob die eingesetzte DNA-Menge durch die Restriktionsenzyme auch vollständig geschnitten worden war, analytische Agarose-Gele gefahren. Um Größenvergleiche zu ermöglichen, wurde als Marker mit dem Restriktionsenzym Eco RI geschnittene Lambda-DNA mitlaufen lassen. Die Größe der sechs Spaltfragmente ist bekannt.

2.2.8.3. Präperative Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

A. Reagenzien

Acrylamidlösung: 30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) N,N'-Bismethylenacrylamid

TBE-Puffer - 10-fach konzentriert -: 0,89 M Tris
0,89 M Borsäure
2,8 mM EDTA

Ammoniumpersulfat

N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TMED)

Elektrophoresepuffer: TBE-Puffer - einfach konzentriert -

Ethidiumbromid: 10 mg/ml in Wasser

Auftragspuffer - zweifach konzentriert -: 10% Glycerin
0,05% Bromphenolblau
0,05% Xylene Cyanole FF

B. Durchführung

Um eine gute Abtrennung zwischen den mit Restriktionsenzymen herausgeschnittenen Histongen-DNA-Abschnitten und dem restlichen Plasmid zu erhalten, wurden 6%ige Polyacrylamid-Gele gefahren. Gegenüber den Agarose-Gelen hatten sie folgende Vorteile:

1. Die Banden erschienen auf den Polyacrylamid-Gelen bedeutend schärfer als auf den Agarose-Gelen.
2. Die Trennfähigkeit war größer.
3. Das Polyacrylamid verhielt sich bei der weiteren Aufarbeitung weniger störend.

Die präperativen Gele wurden in Form von Platten-Gelen (12cm x 15cm) gefahren. Durch das Einführen dickerer Trennstäbe (0,75cm) wurde erreicht, daß größere Mengen auf das Gel aufgetragen werden konnten. Durch einen Arbeitsschritt konnten dadurch größere Mengen an gereinigter Histongen-DNA isoliert werden. Da das Abdichten dieser Gele problematisch war, wurden die Trennstäbe sowohl gut eingefettet als auch durch das Polymerisieren einer 1,5%igen Agaroselösung von außen her abgedichtet. Dann wurden 25 ml Acrylamidlösung, 12,5 ml TBE-Puffer und 80 mg Ammoniumpersulfat mit Wasser auf 125 ml aufgefüllt, gut durchgemischt, kurz entlüftet, mit 43 µl TMED versetzt und

zwischen die Glasplatten gegossen. Mit einem speziell angefertigten Kamm, der mit einpolymerisiert wurde, wurde eine einzige Auftragsfläche geschaffen. Die DNA-Menge, die auf ein solches Gel aufgetragen werden konnte, lag zwischen 100 und 150 µg, die in etwa dem gleichen Volumen an Auftragspuffer gelöst vorlagen. Das Auftragen der Probe erfolgte gleichmäßig über die gesamte Auftragsfläche.

Für die Abtrennung des nur 2,0 kb großen Histongen-DNA-Abschnittes des Plasmids psp 17 war eine Laufzeit von 8 bis 10 Stunden bei 125 Volt konstant ausreichend. Die Laufzeit für die Abtrennung des 4,58 kb großen psp 2 Histongen-DNA-Abschnittes und des ungefähr 6,3 kb großen pCO2-Abschnittes lag bei 20 bzw. 24 Stunden. Zum Sichtbarmachen der Banden unter UV-Licht wurde das Gel wie bereits beschrieben mit Ethidiumbromid angefärbt.

2.2.8.4. Isolierung des Seeigel-Histongen-DNA-Abschnittes

A. Reagenzien

TBE-Puffer: 0,2-fach konzentriert
Chloroform-Isoamylalkohol: 24:1 (v/v)
Na-Acetat: 3 M in Wasser pH 6,5
Aufnahmepuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,6
1 mM EDTA

B. Durchführung

Um bei der weiteren Isolierung der Histongen-DNA die Verluste möglichst gering zu halten, wurden die weiteren Schritte nur unter Verwendung siliconisierter Glas- und Eppendorf-Gefäße durchgeführt. Aus dem präperativen Polyacrylamid-Gel wurde unter UV-Licht die Histongen-DNA-Bande mit einem scharfen Messer herausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde dann vorsichtig in einen durch Auskochen in Na-Bicarbonat, EDTA und bidestilliertem Wasser vorbehandelten Dialyseschlauch, der mit 0,2-fach konzentriertem TBE-Puffer gefüllt war, überführt. Der Dialyseschlauch wurde dann in eine verschließbare Elektrophoresekammer gelegt. Diese war ebenfalls mit dem TBE-Puffer gefüllt. Durch Anlegen eines

elektrischen Stromes mit 40 mA konstant wurde die DNA aus dem Gelstück in den Puffer des Dialyseschlauches elektrophoretisiert. Dieser Vorgang dauerte etwa 24 Stunden. Zwischenzeitlich wurde der Puffer in der Kammer gewechselt. Vor dem Abschalten der Elektrophorese wurde für zwei bis drei Minuten eine Ladungsumkehr vorgenommen, um die DNA-Moleküle, die eine starke Affinität zur Dialysemembran aufweisen und somit leicht an dieser anheften, wieder abzulösen. Nachdem der Puffer vorsichtig aus dem Dialyseschlauch entfernt worden war, wurde der Dialyseschlauch noch einmal mit dem Puffer ausgespült. Anschließend erfolgte eine einmalige Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion. Die wäßrige Phase wurde nach der Zentrifugation mit 1/10 vol Na-Acetat und 2,5 vol Äthanol über Nacht bei -20°C gefällt, abzentrifugiert und das Pellet in einem kleinen Volumen (100 µl) des Aufnahmepuffers aufgenommen. Mit einem Aliquot wurde ein analytisches Agarose-Gel gefahren, mit dem die Reinheit und die Ausbeute der Isolierungsmethode überprüft wurden.

2.2.9. In-vitro-Präperation einer ^{32}P-markierten komplementären RNA (cRNA) von gereinigter Seeigel-Histongen-DNA

A. Reagenzien

Reaktionspuffer
- 10-fach konzentriert -: 0,1 M $MgCl_2$
0,1 M β-Mercaptoäthanol
1 M KCl
0,5 M Tris-HCl pH 7,9

ATP, CTP, UTP: Lösung mit je 5 mM in Wasser
DNAase I: 1 mg/ml in 0,1 N HCl pH 3,0
E.coli-tRNA: 2 mg/ml in Wasser
Chlorform-Isoamylalkohol: 24:1 (v/v)
Na-Acetat: 3 M in Wasser pH 6,5
Aufnahmepuffer: 10 mM Tris-HCl (steril)
1 mM EDTA
Tris-HCl: 100 mM in Wasser pH 8,0 (steril)
E.coli RNA-Polymerase

Säulenpuffer: 0,25% SDS
0,1 M NaCl
1 mM EDTA
20 mM Tris-HCl pH 7,6

B. Durchführung

Die gewünschte Menge an Ci α-^{32}P-markiertes GTP (200-500 μCi) wurde in einem siliconisierten Eppendorf-Gefäß bei -80°C eingefroren und lyophilisiert. Zu dem lyophilisierten Material wurden nacheinander 10 μl des Reaktionspuffers, 10 μl der Lösung mit den 'kalten' Nukleotiden, die erforderliche Menge an DNA (2-4 μg) und 3 μl der RNA-Polymerase gegeben und mit bidestilliertem Wasser auf 100 μl aufgefüllt. Der Ansatz wurde über eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde unterbrochen durch Zugabe von 10 μl DNAase I-Lösung, 20 μl E.coli-tRNA-Lösung. Mit der Tris-HCl-Lösung wurde auf 200 μl aufgefüllt. Die Probe wurde dann für 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurde einmal mit Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Die wäßrige Phase wurde nach der Zentrifugation auf eine Sephadex G50-Säule (20cm x 1cm), die mit dem Säulenpuffer äquilibriert war, aufgetragen. Mit dem Säulenpuffer wurde eluiert. Es wurden Fraktionen mit 15 Tropfen (320 μl) gesammelt. Jeweils 1 μl der Fraktionen wurden in Bray's Szintillationsflüssigkeit gezählt. Die aktiven Fraktionen wurden einzeln mit 1/10 vol Na-Acetat und 2,5 vol Äthanol für zwei Stunden bei -80°C gefällt, abzentrifugiert und in je 50 μl des Aufnahmepuffers gelöst. Die einzelnen Fraktionen wurden dann vorsichtig mit einmaligem Nachwaschen in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Von einem μl wurde zur Bestimmung der Ausbeute die Radioaktivität ermittelt.

2.2.10. DNA - RNA-Hybridisierungen

2.2.10.1. Denaturierung und Neutralisierung der DNA

A. Reagenzien

NaOH: 1 N in Wasser

Neutralisierungsgemisch: 1 Teil 1 M Tris-HCl pH 7,9 (steril)
2 Teile 3 M NaCL (steril)
1 Teil 1 N HCl

B. Durchführung

Die Hybridisierungen wurden im wesentlichen durchgeführt nach der Methode von Gillespie und Spiegelman (1965). Zu den von den CsCl-Dichtegradienten stammenden Fraktionen wurden jeweils 1 ml 1N NaOH gegeben. Nach gründlichem Vermischen wurden die Proben für 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurde mit 4 Volumina - bezogen auf das eingesetzte NaOH-Volumen - des Neutralisierungsgemisches neutralisiert. Das Erreichen eines neutralen pH-Wertes wurde mit pH-Papier überprüft.

2.2.10.2. Aufbringen der denaturierten DNA-Proben auf Nitrocellulose-Filter

A. Reagenzien

2 x SSC: 0,3 M NaCl
0,03 M Na-Citrat

B. Durchführung

Die Nitrocellulose-Filter (Porengröße 0,45 µm, Durchmesser 23 mm) wurden vorsichtig beschriftet, für einige Minuten in 2 x SSC eingeweicht und auf das Millipore-Filtergerät gelegt. Auf dem Filtergerät wurden sie noch einmal mit 10 ml des gleichen Puffers gewaschen. Dann wurden die DNA-Proben auf die Filter aufgebracht. Die Durchlaßgeschwindigkeit wurde auf 2-3 min/ml Flüssigkeit eingestellt. Anschließend wurde jedes Filter auf dem Millipore-Gerät mit 100 ml 2 x SSC gewaschen. Die Filter wurden dann für mindestens 4 Stunden bei Zimmertemperatur und für 2 Stunden im Vakuumofen bei 80°C getrocknet.

2.2.10.3. Filterhybridisierung

A. Reagenzien

Hybridisierungsgemisch: 40% Formamid (über Amberlite gereinigt)
0,1% SDS
100 µg/ml E.coli-tRNA
2 x SSC

RNAase A: 2 mg/ml in Wasser (für 2-3 min auf 80°C erhitzt)

B. Durchführung

Für die 29 beladenen Filter eines Gradienten und für einen Leerfilter wurde ein Hybridisierungsvolumen von 5 ml benötigt. Die Hybridisierungen wurden in Glasszintillationsgefäßen durchgeführt. An radioaktiv markierter cRNA wurden, da es sich um eine heterologe Hybridisierungsreaktion handelte, 4 bis 5 x 10^6 cpm/ml Hybridisierungsgemisch eingesetzt. Das Hybridisierungsgemisch wurde gut mit der cRNA-Probe vermischt. Dann wurden die Filter vorsichtig in die Glasszintillationsgefäße überführt. Alle Filter mußten mit der Hybridisierungslösung bedeckt sein. Die Hybridisierung lief über 16 Stunden bei 40°C im Wasserbad.

Danach wurden die Filter vorsichtig aus den Glasszintillationsgefäßen in Ein-Liter-Bechergläser überführt. Unter leichtem Bewegen wurden sie dort in der Hybridisierungslösung, die allerdings keine E.coli-tRNA mehr enthielt, über eine Stunde gewaschen. Daran schloß sich ein dreistündiges Waschen in 2 x SSC an. Der Puffer wurde dabei stündlich gewechselt. In Glasszintillationsgefäßen erfolgte dann eine 30-minütige RNAase A-Behandlung mit 50 µg RNAase A/ml. Die RNA-Verdauung erfolgte in einem Volumen von fünf ml und bei Zimmertemperatur. Zum Abschluß wurde noch zweimal für je eine Stunde in 2 x SSC gewaschen. Dann wurden die Filter getrocknet und in 5 ml Toluol die Radioaktivität bestimmt. Von den Werten für die einzelnen Fraktionen wurde der Hintergrundswert des Leerfilters abgezogen.

2.2.11. DNA - RNA-Hybridisierungen mit geschnittener Gesamt-HeLa- und Placenta-DNA

2.2.11.1. Schneiden von Placenta- und HeLa-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen

A. Reagenzien

Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym Eco R1
- 10-fach konzentriert -: 1 M Tris-HCl pH 7,5
0,5 M NaCl
0,1 M $MgCl_2$

Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym Hind III
- 10-fach konzentriert -: 60 mM Tris-HCl pH 7,5
60 mM $MgCl_2$
0,5 M NaCl
1 mg/ml Albumin

Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym Bam I
- 10-fach konzentriert -: 1 M Tris HCl pH 7,5
0,1 M $MgCl_2$

Reaktionspuffer für das Restriktionsenzym Pst I
- 10-fach konzentriert -: 0,1 M Tris-HCl pH 7,0
0,5 M NaCl
0,1 M $MgCl_2$

Chloroform-Isoamylalkohol: 24:1 (v/v)
Na-Acetat: 3 M in Wasser pH 6,5 (steril)
DNA-Aufnahmepuffer: 5% Glycerin
0,025% Bromphenolblau
0,025% Xylene Cyanole FF

B. Durchführung

Die Ansätze wurden in siliconisierten Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Um sicher zu gehen, daß die eingesetzte DNA von dem jeweiligen Enzym auch vollständig geschnitten wurde, wurde die eingesetzte Enzymmenge gegenüber der Isolierung der Seeigel-Histongen-DNA-Abschnitte erhöht und auch die Inkubationszeit wesentlich verlängert. Zu je 5 µg HeLa- bzw. Placenta-DNA wurden 5 µl des jeweiligen konzentrierten Puffers und die folgenden Enzymmengen gegeben: 2 µl des Restriktionsenzyms Eco R1, 2 µl Hind III, 5 µl Bam I und

3 µl Pst I. Dann wurde mit bidestilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Um zu zeigen, daß die Verdauung mit den Enzymen vollständig abgelaufen war, wurde ein Ansatz mit einem Gemisch von jeweils 1,5 µg Lambda-, Placenta- und HeLa-DNA mit dem Restriktionsenzym Eco R1 verdaut. Das Auftreten der Verdauungsfragmente der Lambda-DNA in den Agarosegelen war ein Maß für die Vollständigkeit der Reaktion. Die Reaktionen wurden für mindestens 5 Stunden oder aber über Nacht bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Nach einer einmaligen Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wurden die wäßrigen Phasen mit 1/10 vol Na-Acetat und 2,5 vol Äthanol für zwei Stunden bei -80°C gefällt, abzentrifugiert und in 20 µl des Aufnahmepuffers gelöst.

2.2.11.2. Auftrennung der geschnittenen DNA auf Agarose-Gelen

A. Reagenzien

wie unter 2.7.2. beschrieben

B. Durchführung

Die Agarose-Gele wurden wie bereits beschrieben hergestellt. Auf die Gele wurden als Marker mit dem Restriktionsenzym Eco R1 geschnittene Lambda-DNA aufgetragen. Für die Autoradiographie dienten als Marker das mit dem Restriktionsenzym Hind III partiell geschnittene pCO2-Plasmid oder die mit dem Restriktionsenzym Eco R1 geschnittene gereinigte Histongen-DNA aus dem Plasmid pCO2. Von den Proben wurden je 6 µl auf das Platten-Gel aufgetragen. McDonell et al. (1977) zeigten, daß die relative Beweglichkeit speziell größerer DNA-Moleküle (> 1000 bp) in den Agarose-Gelen stark beeinflußt wird von der angelegten Spannung. Dies äußert sich darin, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle nicht nur von ihrem Molekulargewicht bestimmt wird. Somit können Größenvergleiche mit Marker-DNA nicht mehr korrekt durchgeführt werden, je höher die angelegte Spannung ist. Deshalb wurden die Agarose-Gele nur mit 60 Volt konstant und über 5 Stunden gefahren. Das Anfärben mit Ethidiumbromid erfolgte dann wie bereits beschrieben.

2.2.11.3. Überführung der DNA von den Agarose-Gelen auf Nitrocellulose-Filter nach der Methode von Southern (1975)

A. Reagenzien

Denaturierungslösung: 0,5 N NaOH
1,5 M NaCL

Neutralisierungslösung: 0,5 M Tris-HCl pH 7,0 - 7,5
1,5 M NaCl

20 x SSC: 3 M NaCl - 0,3 M Na-Citrat

2 x SSC: 0,3 M NaCl - 0,03 M Na-Citrat

B. Durchführung

Um die DNA auf den Agarose-Gelen zu denaturieren, wurde eine Glasschale mit 500 ml der Denaturierungslösung gefüllt, und das Gel für 15 Minuten in die Flüssigkeit gelegt. Anschließend wurde das Gel in eine Glasschale überführt, die 500 ml der Neutralisierungslösung enthielt. Auch dort wurde das Gel für 15 Minuten belassen. Mit dem so vorbehandelten Gel konnte die Überführung der DNA vorgenommen werden. Dazu wurde auf zwei Glasschalen, die mit je 250 ml 20 x SSC gefüllt waren, eine Glasplatte (15,5cm x 32,5cm) gelegt. Die Glasplatte wurde bedeckt mit einem Filterpapier (45cm x 15,5cm), das in 20 x SSC getränkt worden war. Die Enden des Filterpapiers wurden so um die Glasplatte geschlagen, daß das Filterpapier auf beiden Seiten bis auf den Boden der Glasschale reichte, damit die darin befindliche Flüssigkeit vollständig aufgesogen werden konnte. Das Filterpapier wurde vollständig mit der Flüssigkeit gesättigt. Zwischen Glasplatte und Filterpapier durften sich keine Luftblasen mehr befinden. Das Gel wurde dann zwischen zwei Abgrenzungsplatten (14cm x 5cm) auf das Filterpapier gelegt. Der Abstand zwischen dem Gel und den Abgrenzungsplatten betrug je 0,5 cm. Das Gel wurde dann luftblasenfrei mit dem Nitrocellulose-Filter (17cm x 12,5cm) bedeckt, das in 2 x SSC gebadet worden war. Die Abmessungen des Filters waren so bemessen, daß es auf den Abgrenzungsplatten auflag. Der Raum zwischen den Abgrenzungsplatten und dem Gel durfte nicht mit Flüssigkeit gefüllt sein. Mit mehreren

Lagen Filterpapier (15cm x 19cm) wurde das Nitrocellulose-Filter abgedeckt. Den Abschluß bildete eine weitere Glasplatte, die noch beschwert wurde. Das Filterpapier saugte dann die Flüssigkeit aus den Glasschalen durch das Gel und das Nitrocellulose-Filter an. Dabei wurde die DNA von dem Gel auf das Nitrocellulose-Filter übertragen. Dieser Vorgang lief über Nacht oder bis die gesamte Flüssigkeit aufgesogen worden war. Anschließend wurde das Nitrocellulose-Filter auf die Größe des Gels gebracht, für 30 Minuten in 2 x SSC gebadet, bei Zimmertemperatur und für zwei Stunden im Vakuumofen bei 80°C getrocknet.

2.2.11.4. DNA - RNA-Filterhybridisierung

A. Reagenzien

Hybridisierungsgemisch: 30 mM Tris-HCl pH 7,6
1 mM EDTA
0,6 M NaCl
50% Formamid (über Amberlite gereinigt)
0,2% SDS
500 µg/ml E.coli-tRNA

RNAase A: 2 mg/ml in Wasser (für 2-3 min auf 80°C erhitzt)

2 x SSC: 0,3 M NaCl - 0,03 M Na-Citrat

B. Durchführung

Die Hybridisierungen wurden in 20 ml-Reagenzgläsern durchgeführt. Von dem Hybridisierungsgemisch wurden 20 ml benötigt. Pro ml Hybridisierungsgemisch wurden 4 bis 5 x 10^6 cpm der ^{32}P-markierten cRNA-Präperation von der Seeigel-Histongen-DNA des Plasmids pCO2 bzw. von dem Plasmid pTS 306 eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte über 24 Stunden bei 40°C im Wasserbad. Dazu wurde das Nitrocellulose-Filter mit dem Hybridisierungsgemisch befeuchtet, vorsichtig eingerollt und in das Reagenzglas überführt. Nach der Hybridisierung wurde das Filter in ein Ein-Liter-Becherglas überführt und zwei- bis dreimal mit dem Hybridisierungsgemisch, das keine E.coli-tRNA mehr enthielt, in 2-Stunden-Intervallen bei 40°C gewaschen. Über mehrere Stunden oder aber über Nacht wurde das Filter dann bei Zimmertemperatur in 2 x SSC gewaschen.

Daran schloß sich eine RNAase A-Behandlung an. Es wurden 50 µg/ml RNAase A eingesetzt. Die Verdauung erfolgte über 30 Minuten bei Zimmertemperatur. Abgeschlossen wurde die Waschprozedur durch ein weiteres mehrmaliges Waschen in 2 x SSC. Anschließend wurde das Filter getrocknet.

2.2.11.5. Autoradiographie

A. Reagenzien

Röntgenfilme: RP-Royal 'X-Omat' der Firma Kodak
Intensifying Screens: Cronex Quanta II der Firma DuPont

B. Durchführung

Das nach der Hybridisierung getrocknete Filter wurde auf ein Filterpapier geklebt und mit Haushaltsfolie abgedeckt. So wurde das Filter unter einen Röntgenfilm gelegt. Die Strahlungsintensität wurde durch die Verwendung eines Intensifying Screens verstärkt. Je nach der eingesetzten Radioaktivität wurde der Film über mehrere Tage bei -80°C belichtet und dann entwickelt.

III. Ergebnisse

3.1. Zellsynchronisierung, DNA-Synthese und Nukleinsäurehybridisierung

3.1.1. DNA-Synthese in synchronisierten HeLa S3-Zellen

Vorbedingung für das Studium des zeitlichen Ablaufs der Replikation bestimmter Gene ist eine effiziente Synchronisierung der Zellen. Ein hoher Prozentsatz der Zellen sollte gleichzeitig in die S-Phase eintreten und sie durchlaufen. Die Synchronisierung der HeLa S3-Zellen, die in einer Ausgangskonzentration von 1,5 bis 2,0 x 10^5 Zellen/ml vorlagen, wurde durch eine Unterbrechung der DNA-Synthese in zwei aufeinanderfolgenden Zellzyklen (Doppelblock) mit Hydroxyharnstoff in einer Konzentration von 1,5 mM erzielt. Hydroxyharnstoff ist ein Inhibitor der Ribonukleotidreduktase und unterbricht die DNA-Replikation infolge Mangel an Vorstufen. Mit dieser Methode erzielten Adams und Lindsay (1967) nach einem einfachen Block in Maus-L-Zellen eine 70%ige Synchronisation der Zellen. Mit der Durchführung eines zweiten Hydroxyharnstoffblockes kann diese Prozentzahl noch erhöht werden.

Um die Kinetik der sich anschließenden DNA-Synthese zu verfolgen, wurde der Einbau von ^{14}C-Thymidin während 15-minütiger Markierungsperioden gemessen. Jeweils 3 ml der Zellsuspension wurden in 1-Stunden-Intervallen mit 1 µCi ^{14}C-Thymidin markiert, die Inkorporation in säurefällbares Material wurde gemessen. Wie die Abbildung 1 zeigt, erreicht die DNA-Synthese in den beiden voneinander unabhängigen Versuchen (A und B) ihr Maximum zwischen der 4. und 6. Stunde nach Aufhebung des Hydroxyharnstoff-Doppelblocks, um dann kontinuierlich abzufallen. Als Maß für eine gute Synchronisierung kann angesehen werden, daß die Werte zu Beginn der 8. und 9. Stunde das Niveau des Anfangswertes erreichen. Im Experiment A zeigt sich etwa zwei Stunden nach Beginn der DNA-Synthese-Periode eine Phase, in der die Syntheserate von 66% des maximalen Wertes auf 60% abfällt. Ein ähnlicher Verlauf für den Thymidin-Einbau wurde auch schon von anderen Autoren beschrieben (Tobia et al., 1970; Breindl und Gallwitz, 1973).

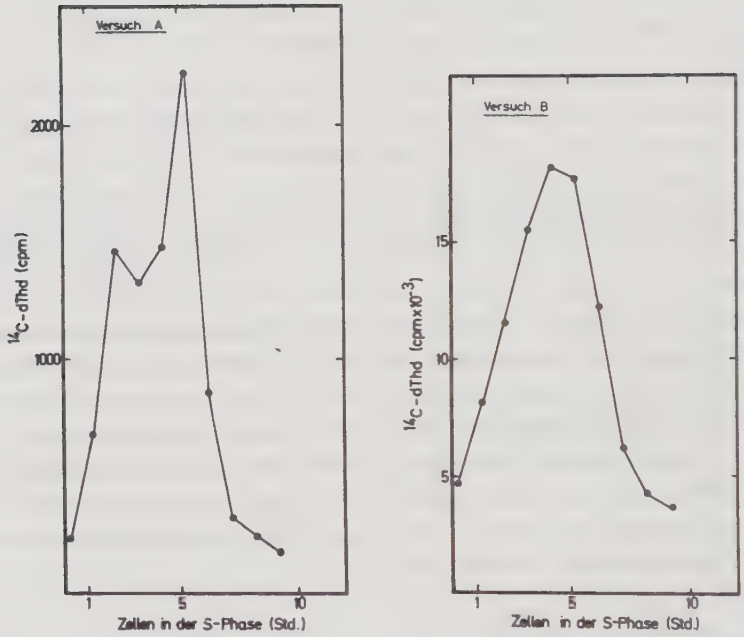

Abbildung 1:

DNA-Synthese in HeLa-Zellen im Verlauf der S-Phase. In zwei voneinander unabhängigen Versuchen (A und B) wurde der Einbau von ^{14}C-Thymidin bestimmt. Zu Beginn jeder Stunde wurden 3 ml Aliquots der Zellsuspension (3,8 - 4,4 x 10^5 Zellen/ml) mit ^{14}C-Thymidin über 15 min inkubiert, anschließend mit kalter 10%iger TCA gefällt, abzentrifugiert, mit TCA, Äthanol und Äther gewaschen, getrocknet und mit 1,5 ml Ameisensäure hydrolysiert. Je 0,5 ml der Proben wurden in Bray's Szintillationsflüssigkeit gezählt.

Nach dem Durchlaufen der S-Phase wurde durch Bestimmung der Zellzahl in halbstündigen Abständen gezeigt, daß zwölf Stunden nach Entfernung des Hydroxyharnstoff-Doppelblockes sich die Zellen innerhalb einer halben bis einer Stunde verdoppelten. Das kann als ein weiteres Indiz für eine gute Synchronisierung angesehen werden.

3.1.2. Einbau von 5-Bromdesoxyuridin in die DNA von HeLa S3-Zellen und Auftrennung von markierter und unmarkierter DNA auf CsCl-Dichtegradienten

Um im Verlauf der S-Phase neu replizierte DNA von noch nicht oder schon replizierter DNA abzutrennen, bietet sich die Markierung der DNA mit 5-Bromdesoxyuridin an. 5-Bromdesoxyuridin wird anstelle des Thymidins in die DNA eingebaut. Die DNA erhält damit eine größere Dichte und kann mittels präperativer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation von unsubstituierter, das heißt nicht in dem betreffenden Markierungsintervall replizierter DNA abgetrennt werden.

Um den Einbau des 5-Bromdesoxyuridins in die DNA zu überprüfen, wurden die Zellen nach dem Hydroxyharnstoff-Doppelblock zunächst über längere Zeiten mit 5-Bromdesoxyuridin (BrdUrd) inkubiert. BrdUrd wurde in einer Konzentration von 10 µM zu den Kulturen hinzugesetzt. Die DNA wurde nach Proteinase- und RNAase-Verdauung mit mehrmaliger Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion isoliert.

Wie Abbildung 2 zeigt, wurden zwei gut voneinander getrennte DNA-Peaks erhalten. Während bei dem 8-Stunden-Markierungsintervall (Abbildung 2 c) die DNA fast vollständig in dem schwereren Bereich zu finden ist, ist nach dem 1-Stunden-Markierungsintervall der Anteil an neu replizierter DNA so gering, daß im Gradientenbild (Abbildung 2 d) nur ein leichter Anstieg im A_{260}-Profil den schwereren Bereich andeutet. Dies reicht aber aus, um unter Übernahme der erwähnten Bedingungen, die DNA aus synchronisierten Zellen über den Zeitraum von jeweils einer Stunde in zehn aufeinanderfolgenden Intervallen, die die Dauer der S-Phase

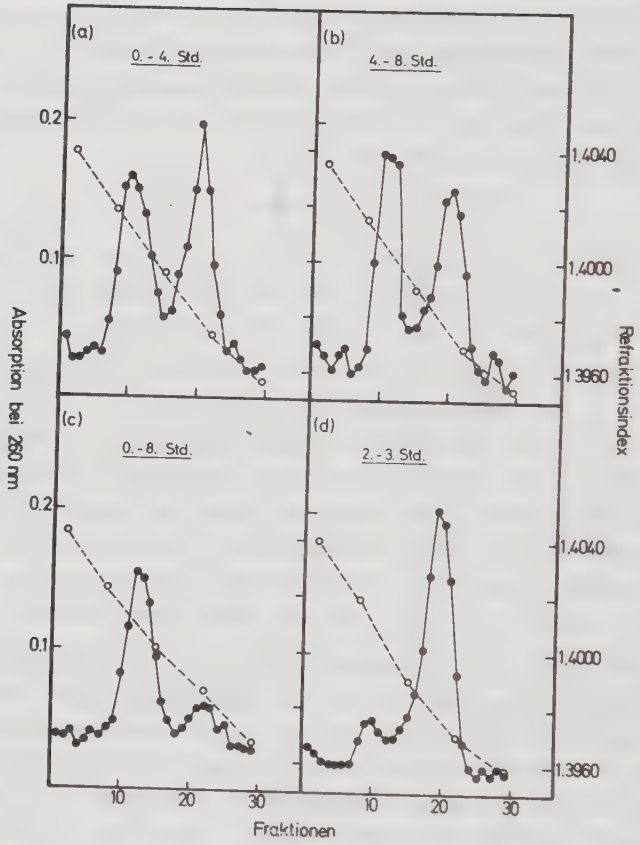

Abbildung 2:

Einbau von 5-Bromdesoxyuridin in neu-replizierte DNA im Verlauf der S-Phase. Vier 200 ml-Kulturen wurden über bestimmte Zeitintervalle nach Aufhebung des Hydroxyharnstoff-Doppelblockes mit 5-Bromdesoxyuridin in einer Endkonzentration von 10 µM markiert. Die DNA wurde isoliert und auf CsCl-Dichtegradienten mit 33000 rpm über 65 Stunden bandiert. Die Gradienten wurden in 29 Fraktionen gesammelt und die Absorption der einzelnen Fraktionen bei 260 nm bestimmt (•——•). Zur Bestimmung der Dichte der Peak-Fraktionen wurde in 5 Fraktionen der Refraktionsindex bestimmt (o---o).

umfassen, zu markieren. Das Ziel war es unter möglichst großer Auflösung neu replizierte DNA erfassen und auch auf Gradienten abtrennen zu können.

Wie der Verlauf des Refraktionsindexes, der bei einigen Fraktionen bestimmt wurde, zeigt, bandiert der schwerere Peak bei einem Refraktionsindex von 1,4010, was nach der in den Methoden erwähnten Umrechnungsformel einer Dichte von 1,718 g/cm^3 entspricht. Der leichtere Peak mit Werten zwischen 1,3975 und 1,3980 entspricht einer Dichte der DNA zwischen 1,680 und 1,685 g/cm^3.

Die Möglichkeit, daß die Anwesenheit von BrdUrd eine Änderung im Ablauf der DNA-Synthese verursachen könnte und somit mögliche Aussagen über den Replikationszeitpunkt bestimmter DNA-Abschnitte in Frage stellen würde, wurde bereits von Balazs und Schildkraut (1971) durch folgenden Versuch unwahrscheinlich gemacht. Sie markierten synchronisierte HeLa-Zellen für die ersten beiden Stunden der S-Phase mit ^{14}C-Thymidin, entfernten dann das radioaktive Material und erlaubten den Zellen die S-Phase mit unmarkiertem Thymidin zu beenden. Nach 72-stündigem zufälligem Wachstum wurden die Zellen resynchronisiert und für die ersten beiden Stunden der S-Phase mit BrdUrd markiert. Die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation ergab, daß der größte Teil des eingebauten Thymidins sich in der BrdUrd-DNA befand.

Daß auch die DNA-Synthese selbst während der S-Phase durch BrdUrd nicht beeinträchtigt wird, zeigten Kajiwara und Mueller (1964) mit fast identischem Einbau von ^{14}C-Thymidin und ^{3}H-BrdUrd in die DNA von HeLa-Zellen nach Aufhebung eines Synchronisierungsblocks. Man kann also davon ausgehen, daß weder der zeitliche Ablauf der Replikation noch die DNA-Synthese an sich durch die Anwesenheit von BrdUrd berührt wird.

3.1.3. Größe der mit 5-Bromdesoxyuridin markierten HeLa-DNA

Um zu überprüfen, ob der Einbau von BrdUrd in die DNA und die Art und Weise der Isolierung der DNA mit mehrfachen Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktionen einen Einfluß auf die Größe der isolierten DNA hat, wurden alkalische 15 - 30%ige Sucrose-Gradienten gefahren. Für den Größenvergleich wurden 28S, 18S und 4S RNA aus HeLa-Zellen als Marker herangezogen, die unter den gleichen Bedingungen aber in neutralen Gradienten aufgetrennt wurden. Zum Vergleich wurde auch die Größe von menschlicher Placenta-DNA bestimmt. Diese DNA wurde nach einer äußerst schonenden Methode von Blin und Stafford (1976) isoliert. Wie die Abbildungen 3 und 4 zeigen, weisen die ausgewählten HeLa-DNA-Proben alle einen geringeren S-Wert auf als die Placenta-DNA. Dies deutet daraufhin, daß die Isolierung der HeLa-DNA zu einer stärkeren Scherung der DNA geführt hat. Diese Scherung könnte möglicherweise dazu führen, daß sich im CsCl-Dichtegradienten eine ausgeprägtere Trennung von A+T- und G+C-reichen Sequenzen ergibt, die zu einer Anreicherung G+C-reicher Histon-codierender Sequenzen (Kedes und Birnstiel, 1971) im schwereren Bereich des DNA-Hauptpeaks führt.

Wie aus der Abbildung 3 weiterhin zu ersehen ist, hat der Einbau von BrdUrd, der in den DNA-Proben aus der frühen S-Phase verstärkt vonstatten gegangen ist (Abbildung 3 b und d), keine Auswirkung auf die Größe der isolierten DNA, da die DNA-Proben aus der späten S-Phase, wo der BrdUrd-Einbau nur noch minimal gewesen ist, ungefähr den gleichen S-Wert aufweisen (Abbildung 3 a und c).

3.1.4. Spezifität der Kreuz-Hybridisierung zwischen HeLa-DNA und komplementärer RNA (cRNA) von Seeigel-Histongen-DNA

Für die Untersuchung der Replikation der menschlichen Histongene in HeLa-Zellen stehen als Hybridisierungsprobe weder hochmarkierte Histon-mRNAs noch die isolierten menschlichen Histongene zur Verfügung. Aus diesem Grunde wurden die clonierten Seeigel-Histongene zur Hybridisierung benutzt.

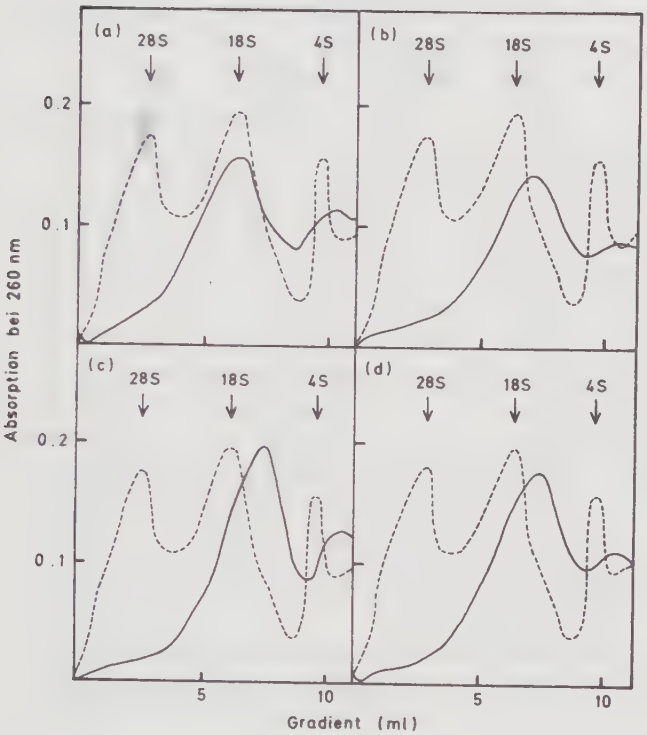

Abbildung 3:

Sucrosegradientenzentrifugation von HeLa-DNA, die zu unterschiedlichen Zeiten im Verlauf der S-Phase in 1-Stunden-Intervallen mit 5-Bromdesoxyuridin markiert wurde:

(a) Markierung mit BrdUrd von der 8.-9.Std. in der S-Phase
(b) " " " " " " 2.-3. " " " "
(c) " " " " " " 9.-10." " " "
(d) " " " " " " 3.-4. " " " "

Je 2,5 A_{260}-Einheiten wurden für 22 Stunden bei 25000 rpm in einem Beckman SW41-Rotor in einem alkalischen 15-30%igen Sucrosegradienten zentrifugiert (———). Auf einem parallelen neutralen Gradienten wurde ribosomale HeLa-RNA als Marker aufgetrennt (----). Die beiden Absorptionsprofile wurden übereinander gelegt.

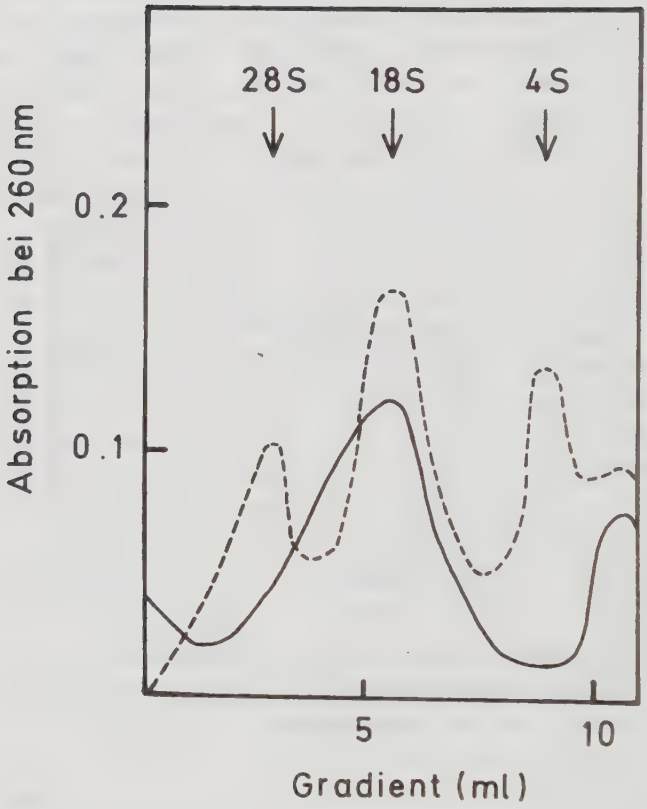

Abbildung 4:

Sucrosegradientenzentrifugation von menschlicher Placenta-DNA. 4 A_{260}-Einheiten wurden für 22 Stunden bei 25000 rpm in einem Beckman SW41-Rotor in einem alkalischen 15-30%igen Sucrosegradienten zentrifugiert (——). Auf einem parallelen neutralen Gradienten wurde ribosomale HeLa-RNA als Marker aufgetrennt (----). Die beiden Absorptionsprofile wurden übereinander gelegt.

Bereits von Melli et al. (1977) war gezeigt worden, daß Seeigel-Histongen-DNA mit ^{3}H-markierter HeLa-Histon-mRNA kreuz-hybridisierte. Sie fanden eine lineare Abhängigkeit der Hybridisierung bei konstanter Menge an DNA und steigenden Mengen an mRNA. Allerdings zeigte der Verlauf der Schmelzkurve des Hybrids zwischen Seeigel-DNA und HeLa-mRNA eine niedrige Hybridisierungseffizienz.

Um die Kreuz-Hybridisierung zwischen Seeigel- und HeLa-Histon-DNA messen zu können, war es notwendig, eine hohe spezifische Aktivität der Hybridisierungsprobe zu erreichen. Diese Hybridisierungsprobe war eine komplementäre RNA (cRNA) der Seeigel-Histongene, die mit α-^{32}P-GTP (350 Ci/mmol) markiert wurde. Die Seeigel (S. purpuratus)-Histongen-DNA war in E.coli mit dem Plasmid pSC 101 als Vehikel von Kedes et al. (1975a) bzw. mit pBR 313 als Vehikel von Overton und Weinberg (1978) cloniert worden. Wie die Abbildung 5 zeigt, enthalten die von Kedes et al. isolierten Plasmide im Fall des psp 17 die Gene für die Histone H2A und H3 mit der intervenierenden Spacer-DNA, im Fall des psp 2 die Gene für die Histone H2B, H4 und H1 mit den intervenierenden Spacer-Regionen. Das Plasmid pCO2 (Overton und Weinberg) enthält eine Repeat-Einheit mit den fünf Histongenen und den intervenierenden Spacer-Regionen. Als Hybridisierungsprobe wurde weiterhin eine cRNA des in pCR1 clonierten H4-Histongens des Seeigels Psammechinus miliaris benutzt (Plasmid pTS 306), das von M. Birnstiel, Universität Zürich, zur Verfügung gestellt wurde.

Zur Herstellung der cRNA wurde im Fall der Plasmide psp 2 und psp 17 bzs. pCO2 nur die Seeigel-Histon-DNA als Matrize benutzt, die durch das Restriktionsenzym Eco R1 im Fall der Plasmide psp 2 und psp 17 bzs. pCO2 aus dem Clonierungsvehikel herausgeschnitten und durch präperative Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese gereinigt wurde (s. Abbildung 6). Aus dem Plasmid pTS 306 wurde der Seeigel-Histon-DNA-Abschnitt nicht herausgeschnitten. Hier diente das ganze Plasmid, das allerdings mit dem Restriktionsenzym Hind III linearisiert wurde, als Matrize.

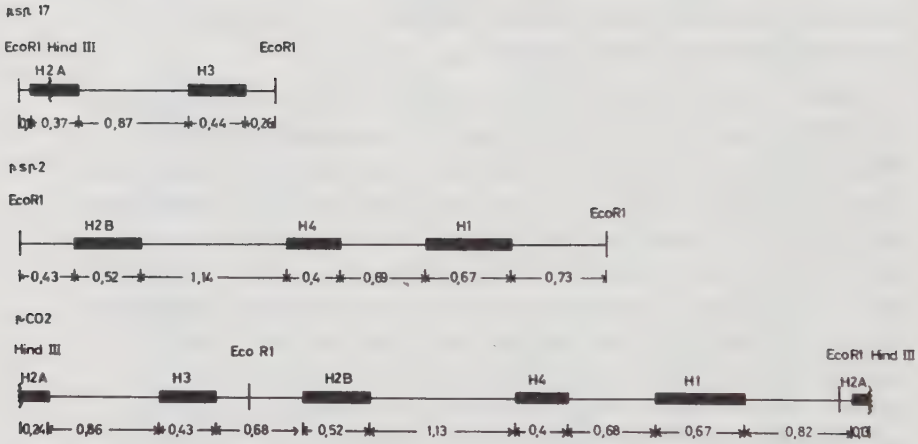

Abbildung 5:

Organisation der Histongene des Seeigels Strongylocentrotus purpuratus.

psp 17 und psp 2:

Die von Kedes et al. (1975a) mit dem Plasmid pSC 101 als Vehikel clonierten Histongen-Abschnitte wurden mit Hilfe des Restriktionsenzyms Eco R1 in das Plasmid eingefügt.

pCO2:

Die von Overton und Weinberg (1978) mit dem Plasmid pBR 313 als Vehikel clonierte Histongen-Repeat-Einheit wurde mit Hilfe des Restriktionsenzyms Hind III in das Plasmid eingefügt.

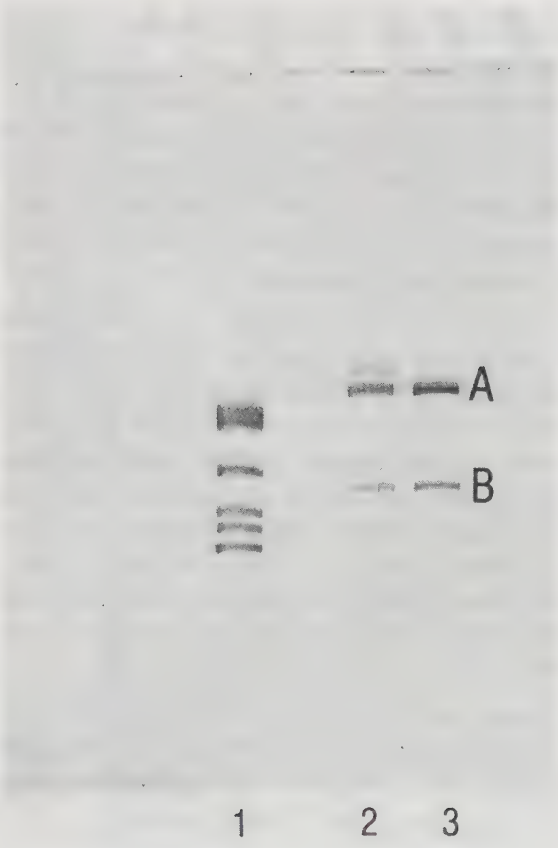

Abbildung 6:

Auftrennung des mit dem Restriktionsenzym Hind III geschnittenen Plasmids pCO2 (s. Abbildung 5) auf einem 6%igen Polyacrylamid-Gel.
Das Plasmid wurde über zwei Stunden bei 37°C mit dem Restriktionsenzym Hind III verdaut. Nach einer Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wurde die DNA gefällt und in dem DNA-Aufnahmepuffer (5% Glycerin, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylene Cyanole FF) gelöst und auf das Gel aufgetragen.
Die Laufzeit des Gels betrug 24 Stunden bei 100 V konstant.

Spur 1: mit dem Restriktionsenzym Eco RI verdaute Lambda-DNA

Spur 2 und 3: das mit dem Restriktionsenzym Hind III verdaute Plasmid pCO2
A: das als Vehikel benutzte Plasmid pBR 313
B: der aus dem Plasmid herausgeschnittene Histongen-Abschnitt des Seeigels S. purpuratus.

Zur Synthese der cRNA wurde unter Anwesenheit der restlichen Nukleotide die E.coli-RNA-Polymerase eingesetzt, die in der Lage ist eukaryontische DNA zu transcribieren. Das synthetisierte Produkt wurde über eine Sephadex-G50-Säule gereinigt. Das ^{32}P-markierte GTP wurde unter der Annahme einer 100%igen Zählausbeute zu 60-65% in die cRNA eingebaut. Eine Ausnahme bildete das Plasmid pTS 306, wo nur 20% des angebotenen GTP in die cRNA eingebaut wurde.

Die cRNA-Probe von dem gereinigten Histongen-Abschnitt aus dem Plasmid pCO2 wurde hinsichtlich ihrer Hybridisierungseffizienz getestet, indem eine konstante Menge HeLa-DNA - 25 µg -, die auf Nitrocellulose-Filtern fixiert worden war, gegen ansteigende Mengen dieser cRNA hybridisiert wurde. Zum Vergleich wurde auch gegen die gleiche Menge von Filter-gebundener Kalbsthymus- bzw. Hefe-DNA hybridisiert. Mit der Hybridisierung gegen E.coli-DNA sollte die Reinheit der Hybridisierungsprobe bzw. der für die cRNA-Präperation eingesetzten DNA, die aus E.coli-Zellen isoliert wird, überprüft werden.

Um eine lange Hybridisierungszeit bei hohen Temperaturen zu umgehen, wurden die Hybridisierungen in Anwesenheit von 40% Formamid bei 40°C für 16 bis 20 Stunden durchgeführt. Weiterhin enthielt die Hybridisierungslösung 0,1% SDS, 100 µg/ml E.coli-tRNA, 2 x SSC und 5 x 10^6 cpm/ml. Nach ausgiebiger Waschung der Filter in der Hybridisierungslösung und in 2 x SSC wurde eine RNAase-Behandlung (50 µg/ml) für 30 Minuten durchgeführt, um 1. den Hintergrund (Background) zu verringern (< als 10% der hybridisierten Radioaktivität) und 2. falsche Hybridisierung weitestgehend auszuschließen. Andere Autoren wie z.B. Melli et al. (1977) verzichteten bei dieser Art von Hybridisierung auf die RNA-Verdauung, um eine höhere Ausbeute an Radioaktivität bei der bekannt geringen Effizienz der Hybridisierungsreaktion zu erreichen.

Wie die Abbildung 7 zeigt, befindet man sich mit den eingesetzten Mengen an RNA in jedem Fall noch im linearen Bereich der Reaktion, wobei die HeLa-DNA die beste Kreuz-

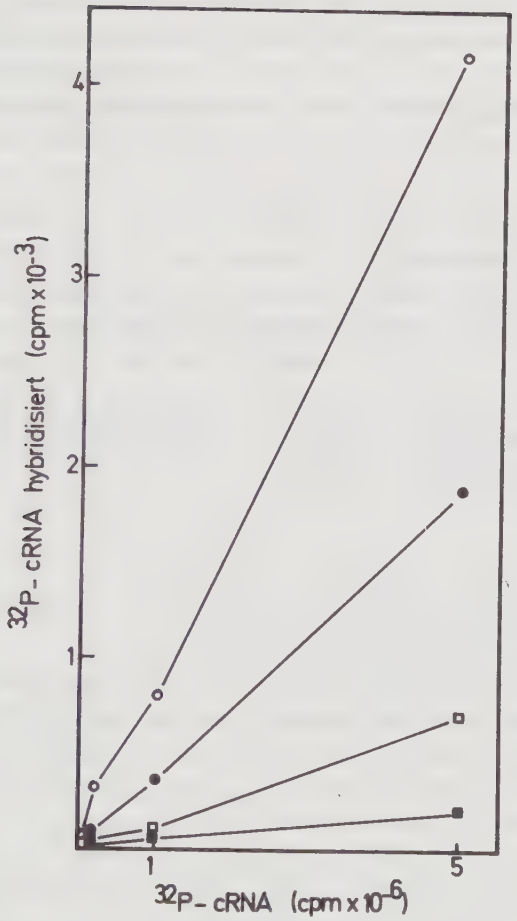

Abbildung 7:

Hybridisierung von DNA unterschiedlichen Ursprungs gegen steigende Mengen an ^{32}P-markierter cRNA von dem Seeigel-Histongen-Insert des Plasmids pCO2. Je 25 µg HeLa- (o——o), Kalbsthymus- (•——•), Hefe- (□——□) und E.coli- (■——■) DNA wurden auf Nitrocellulose-Filtern fixiert. Die Hybridisierung wurde für 16 Std. bei 40°C in 40% Formamid, 0,1% SDS, 100 µg/ml E.coli tRNA und 2 x SSC mit 5 x 10^6 cpm/ml durchgeführt. Der Waschvorgang schloß eine RNAase-Behandlung ein. Der Leerfilterwert wurde von den einzelnen Werten abgezogen.

Hybridisierung zeigt. Der deutliche Anstieg der hybridisierbaren Radioaktivität, den man auch bei hohen Einsätzen an RNA noch erhält, zeigt, daß die Hybridisierungsbedingungen so gewählt worden sind, daß die DNA im Überschuß vorliegt und somit nicht zum limitierenden Faktor der Reaktion wird.

Die schwache Hybridisierung, die sich gegen die E.coli-DNA ergibt, deutet daraufhin, daß bei der Präperation der cRNA eine Verunreinigung mit E.coli-DNA vorgelegen haben kann. Dies sollte sich bei der Hybridisierung gegen HeLa-DNA allerdings nicht als störend bemerkbar machen, und der etwa 20-fach höhere Wert an hybridisierter Radioaktivität für HeLa-DNA ist ausreichend um die Spezifität der Reaktion zwischen Seeigel-Histongen-cRNA und HeLa-DNA als gegeben anzusehen.

3.1.5. Hybridisierung von HeLa-DNA gegen komplementäre RNA (cRNA) des Plasmids pBR 322

Um eine Kreuz-Hybridisierung zwischen HeLa-DNA und dem als Vehikel benutzten Plasmid pBR 322, das die herausgeschnittene Histon-DNA leicht kontaminieren kann, auszuschließen, wurde die Hybridisierungsreaktion zwischen HeLa-DNA und einer cRNA des Plasmids pBR 322 überprüft.

Tabelle 1: Hybridisierung von ^{32}P-markierter cRNA des Plasmids pBR 322 gegen DNA verschiedenen Ursprungs

Je 25 µg DNA wurden auf Nitrocellulose-Filtern fixiert. Einsatz an ^{32}P-cRNA: 5 x 10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung

	Leerfilter	HeLa-DNA	Kalbsthymus-DNA	Hefe-DNA
^{32}P-cRNA hybridisiert (cpm)	101	548	341	372
	129	514	487	400

Das Plasmid pBR 322 wurde dazu mit dem Restriktionsenzym Eco R1 linearisiert und mit E.coli-RNA-Polymerase transcribiert. PBR 322 ist verwandt mit den Plasmiden, in denen die benutzte Seeigel-Histon-DNA cloniert wurde. Bei der Synthese dieser cRNA wurden etwa 70% der eingesetzten Menge an ^{32}P-GTP in die RNA eingebaut.

Auch hier wurden 25 µg HeLa-DNA auf Nitrocellulose-Filtern fixiert und zur Hybridisierung 5 x 10^6cpm/ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Ansonsten galten die gleichen Bedingungen wie bei der Hybridisierung gegen Seeigel-Histongen-cRNA.

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, hybridisieren die eingesetzten DNA-Proben alle leicht gegen die cRNA. Die Werte für die Hybridisierung gegen HeLa-DNA liegen gegenüber dem durch den Leerfilter angegebenen Hintergrundswert etwa fünfmal höher. Dieser Wert ist jedoch gering gegenüber denen in Abbildung 7. Es ist weiterhin zu bedenken, daß die in Tabelle 1 dargestellten Hybridisierungswerte mit einer viel größeren Menge radioaktiver pBR 322-cRNA erreicht wurden, als die in der Abbildung 7 dargestellten Werte, da hier die pBR 322-cRNA nur als geringfügig kontaminierender Bestandteil vorliegt.

3.2. Hybridisierung von fraktionierter HeLa-DNA gegen komplementäre RNA (cRNA) von Seeigel-Histon-DNA

Die Fraktionierung von Gesamt-HeLa-DNA auf CsCl-Dichtegradienten könnte möglicherweise zu einer Anreicherung der Histon-DNA-Sequenzen im schwereren Bereich des Gradienten führen. Dies wäre einmal zurückzuführen auf den von Adesnik und Darnell (1972) beschriebenen hohen G+C-Gehalt der Histon-mRNA aus HeLa-Zellen von 53,8%, zum anderen auf die 30- bis 40-fache Reiteration der Histongene im menschlichen Genom (Wilson und Melli, 1977). Kedes und Birnstiel (1971) zeigten für Seeigel-DNA, wo die Histon-codierenden Sequenzen 0,2% der gesamten DNA ausmachen, durch Hybridisierung gegen die mRNA eine Ver-

schiebung der Histon-codierenden Sequenzen in den schwereren Bereich des Gradienten. Eine Reinigung der Histon-DNA-Sequenzen als Satelliten-Bande gelang allerdings erst durch die Verwendung von Actinomycin D-Gradienten, in denen durch Interkalation des Actinomycins D in G+C-reiche DNA, diese von A+T-reichen DNA-Abschnitten getrennt wird. Dies ist auf den A+T-Reichtum der Spacer-DNA zurückzuführen (Portmann et al., 1976), der eine größere Verschiebung der Histon-DNA zum schwereren Bereich im CsCl-Dichtegradienten verhindert. Das Scheren der DNA zu einer Fragmentgröße von ungefähr 1000 bp und einer damit verbundenen Trennung von A+T- und G+C-reichen Regionen ergab auf neutralen CsCl-Dichtegradienten die erwartete Bandierung der Histon-codierenden Sequenzen als Satelliten-Bande (Kedes und Birnstiel, s.o.).

Wird HeLa-DNA aus logarithmisch wachsenden Zellen auf CsCl-Dichtegradienten fraktioniert, ist keine im A_{260}-Profil sichtbare Anreicherung von G+C-reichen Sequenzen nachzuweisen. Hybridisiert man dagegen die einzelnen Fraktionen des Gradienten nach Fixierung auf Nitrocellulose-Filtern gegen eine cRNA des Seeigel-Histongen-Inserts des Plasmids pCO2 (Abbildung 8), so findet man einen Teil der hybridisierbaren Radioaktivität deutlich zum schwereren Bereich des DNA-Peaks hin verschoben. Die restliche hybridisierbare Radioaktivität ist dagegen eher zum leichteren Bereich hin verschoben. Ein ähnlicher Hybridisierungsverlauf (Abbildung 9) ergibt sich auch bei der Hybridisierung von fraktionierter HeLa-DNA gegen eine cRNA des gesamten Plasmids pTS 306 (Vektor und Insert), das nur das H4-Histongen mit einigen flankierenden Sequenzen (etwa 50 Nukleotide zum 5' und 3'-Ende) aus dem Seeigel Psammechinus miliaris enthält. Die mehr als eine Zehnerpotenz niederiger liegende Hybridisierungsaktivität bei gleichem Einsatz an Radioaktivität ergibt sich daraus, daß nur ein Teil der cRNA Histon-spezifische Sequenzen trägt und diese auch nur für ein Histon codieren. Auch hier findet man einen Teil der Hybridisierungsaktivität deutlich im schwereren Bereich, während sich die

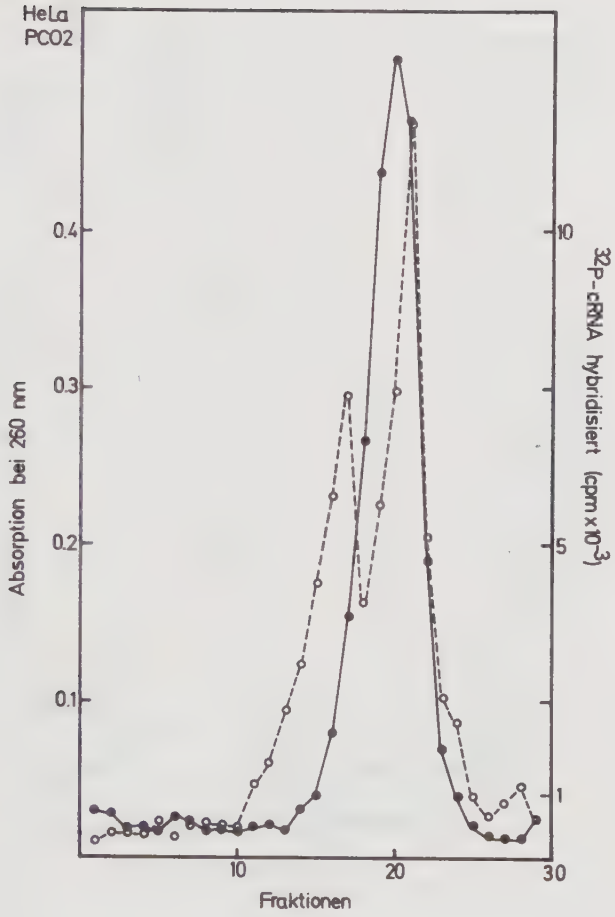

Abbildung 8:

Hybridisierung von auf CsCl-Dichtegradienten fraktionierter HeLa-DNA aus logarithmisch wachsenden Zellen gegen 32-P-markierte cRNA von dem Seeigel Histongen-Insert des Plasmids pCO2. 150 µg HeLa-DNA wurden in CsCl-Dichtegradienten mit 33000 rpm über 65 Stunden bei 25°C bandiert. Die Gradienten wurden in 29 Fraktionen gesammelt und die Absorption der einzelnen Fraktionen bei 260 nm bestimmt (• ——— •). Die 29 Fraktionen wurden auf Nitrocellulose-Filtern fixiert und gegen 32-P-markierte cRNA von dem Seeigel-Histongen-Insert des Plasmids pCO2 hybridisiert (o----o). Die Hybridisierung wurde durchgeführt wie unter Abbildung 7 beschrieben. Die Hybridisierungslösung enthielt 4 x 10^6cpm/ml Hybridisierungslösung. Der Leerfilterwert wurde von den einzelnen Werten abgezogen.

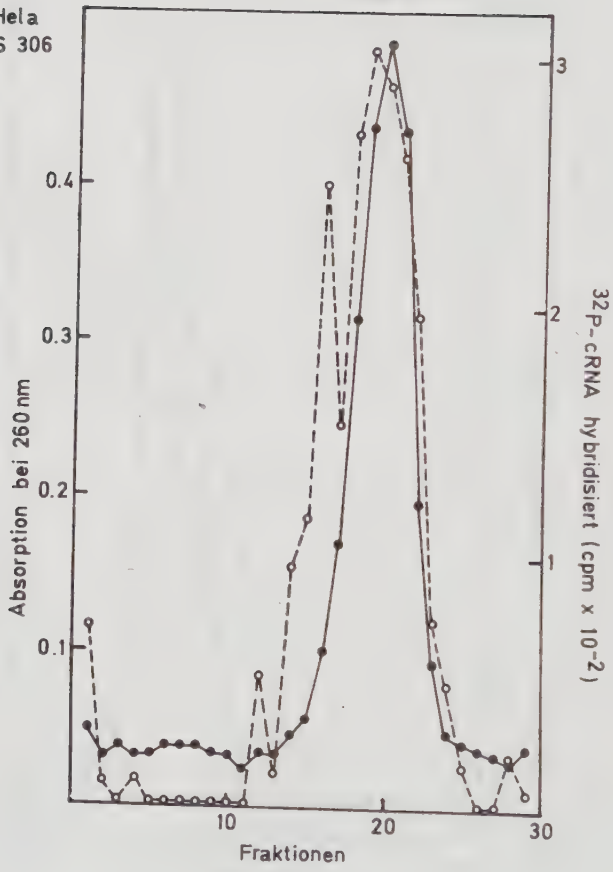

Abbildung 9:

Hybridisierung von auf CsCl-Dichtegradienten fraktionierter HeLa-DNA aus logarithmisch wachsenden Zellen gegen 32-P-markierte cRNA von dem Plasmid pTS 306. 150 µg HeLa-DNA wurden in CsCl-Dichtegradienten mit 33000 rpm über 65 Stunden bei 25°C bandiert. Die Gradienten wurden in 29 Fraktionen gesammelt und die Absorption der einzelnen Fraktionen bei 260 nm bestimmt (•——•). Die 29 Fraktionen wurden auf Nitrocellulose-Filtern fixiert und gegen 32-P-markierte cRNA von dem Plasmid pTS 306 hybridisiert (o----o). Die Hybridisierungslösung enthielt 4 x 10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung. Die Hybridisierung wurde durchgeführt wie unter Abbildung 7 beschrieben. Der Leerfilterwert wurde von den einzelnen Werten abgezogen.

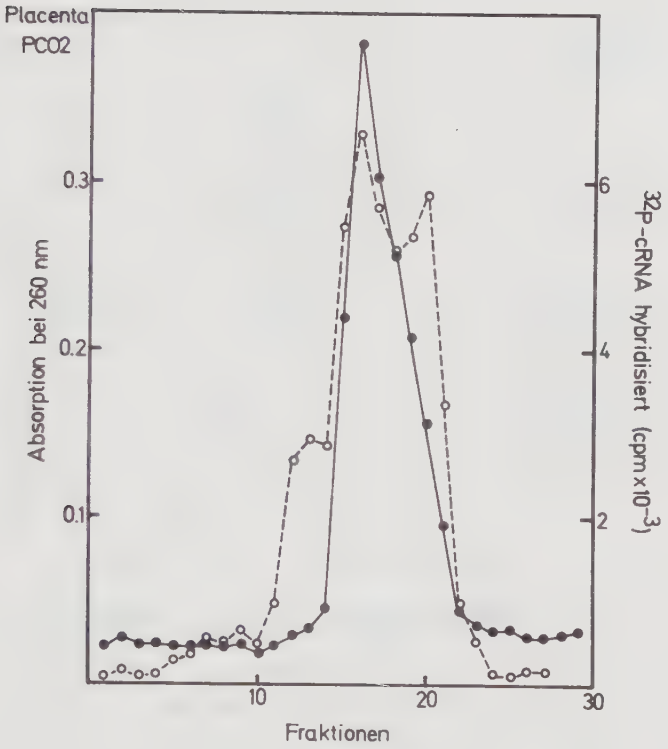

Abbildung 10:

Hybridisierung von auf CsCl-Dichtegradienten fraktionierter menschlicher Placenta-DNA gegen 32-P-markierte cRNA von dem Seeigel-Histongen-Insert des Plasmids pCO2. 150 µg Placenta-DNA wurden in CsCl-Dichtegradienten mit 33000 rpm über 65 Stunden bei 25°C bandiert. Die Gradienten wurden in 29 Fraktionen gesammelt und die Absorption der einzelnen Fraktionen bei 260 nm bestimmt (•——•). Die 29 Fraktionen wurden auf Nitrocellulose-Filtern fixiert und gegen 32-P-markierte cRNA von dem Seeigel-Histongen-Insert des Plasmids pCO2 hybridisiert (o---o). Die Hybridisierungslösung enthielt 4 x 10^6cpm/ml Hybridisierungslösung. Die Hybridisierung wurde durchgeführt wie unter Abbildung 7 beschrieben. Der Leerfilterwert wurde von den einzelnen Werten abgezogen.

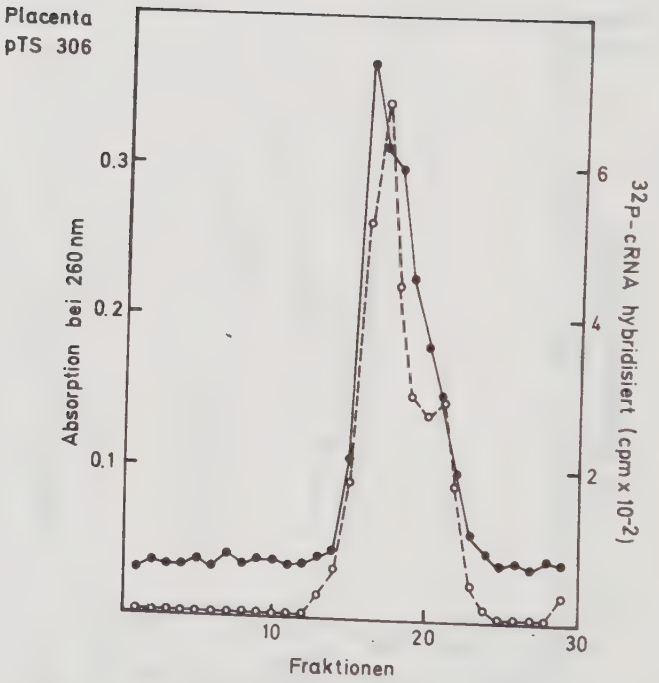

Abbildung 11:

Hybridisierung von auf CsCl-Dichtegradienten fraktionierter menschlicher Placenta-DNA gegen 32-P-markierte cRNA vom Plasmid pTS 306. 150 µg Placenta-DNA wurden in CsCl-Dichtegradienten mit 33000 rpm über 65 Stunden bei 25°C bandiert. Die Gradienten wurden in 29 Fraktionen gesammelt und die Absorption der einzelnen Fraktionen bei 260 nm bestimmt (• ——•). Die Fraktionen wurden auf Nitrocellulose-Filtern fixiert und gegen 32-P-markierte cRNA von dem Plasmid pTS 306 hybridisiert (o---o). Die Hybridisierungslösung enthielt 4 x 10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung. Die Hybridisierung wurde durchgeführt wie unter Abbildung 7 beschrieben. Der Leerfilterwert wurde von den einzelnen Werten abgezogen.

restliche Radioaktivität mit einer Tendenz zum leichteren Teil hin über den DNA-Peak verteilt. Eine Erklärung für dieses Hybridisierungsmuster könnte das aufgrund der Isolierungsmethode starke Scheren der DNA sein, das zu einem willkürlichen Verteilungsmuster an DNA-Molekülen geführt hat, die sich in ihrem G+C-Gehalt unterscheiden. Dieses Verteilungsmuster würde dann auch die Histongen-DNA-Abschnitte betreffen, so daß die Hybridisierung auf der einen Seite Moleküle erfassen würde, die fast ausschließlich Histon-codierende somit G+C-reiche Sequenzen enthalten, während andere Histon-DNA-Abschnitte mit A+T-reichen Spacer- oder flankierenden Sequenzen angereichert sein könnten.

Ähnliche Hybridisierungsmuster wurden mit menschlicher Placenta-DNA erhalten, die nach der Fraktionierung auf CsCl-Dichtegradienten mit beiden Proben hybridisiert wurde (Abbildungen 10 und 11). Dieser Befund ist insofern bedeutungsvoll, als die benutzte Placenta-DNA unter schonenden Bedingungen isoliert wurde und ein relativ einheitliches Molekulargewicht von etwa 30 x 10^6 Daltons aufweist.

3.3. Replikation der Histongene während der S-Phase von HeLa-Zellen

Um den zeitlichen Verlauf der Replikation der Histongene in HeLa-Zellen im Verlauf der S-Phase zu bestimmen, wurden zehn 200 ml-Kulturen nach dem Entlassen aus dem Hydroxyharnstoff-Doppelblock in aufeinanderfolgenden 1-Stunden-Intervallen mit 5-Bromdesoxyuridin markiert. Der Einbau wurde über zehn Stunden verfolgt, um die gesamte S-Phase der HeLa-Zellen zu erfassen. Nach jedem Markierungsintervall wurde die DNA isoliert und je 80 µg in CsCl-Dichtegradienten bandiert. Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten fraktioniert und 29 Fraktionen gesammelt. Nach der Bestimmung der Absorption bei 260 nm wurde die DNA der einzelnen Fraktionen auf Nitrocellulose-Filtern fixiert und gegen die ^{32}P-markierte cRNA des Histongen-Inserts des Plasmids pCO2 bzw. der Plasmide psp 2 und psp 17 hybridisiert. Die Hybri-

disierungslösung enthielt 5 x 10^6 cpm, die Hybridisierungen mit dieser Menge radioaktiver RNA lagen, wie oben beschrieben, im linearen Bereich der Reaktion, so daß unter DNA-Überschuß-Bedingungen hybridisiert wurde. Nach einem intensiven Waschvorgang, der unter anderem auch trotz einer schon beschriebenen möglichen Reduzierung der Ausbeute eine RNA-ase-Behandlung beinhaltete, wurden die Filter getrocknet und die Radioaktivität durch Szintillationszählung bestimmt. Das Auftreten von Radioaktivität im schwereren, BrdUrd-enthaltenden DNA-Bereich weist dann auf eine Replikation Histon-spezifischer Sequenzen in diesem Markierungsintervall hin, da gleichzeitig mit der Replikation bestimmter DNA-Abschnitte BrdUrd in diese neu-synthetisierte DNA eingebaut wird.

Nach diesem Muster wurden zwei voneinander unabhängige Versuche (A und B) durchgeführt, wobei für jedes Markierungsintervall die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation als Duplikate und auch die Hybridisierung getrennt durchgeführt wurde.

Der Versuch A ist in den Abbildungen 12.1. - 12.10. dargestellt. Wie aus den Abbildungen zu ersehen ist, beginnt bereits in der ersten Stunde der S-Phase die Replikation der Histongene, allerdings nimmt die Hybridisierung im Bereich der neu-replizierten DNA bis zur 4. Stunde zu, um dann wieder abzufallen. Zwischen der zweiten und vierten Stunde der S-Phase, also noch vor dem Erreichen des Maximums der DNA-Synthese, ist die anteilsmäßig höchste Hybridisierung im Bereich der neu-replizierten DNA zu finden. Es ist auch in dem Zeitintervall mit der höchsten DNA-Syntheserate zwischen der vierten und sechsten Stunde (s. Abbildung 1) eine deutliche Hybridisierung im BrdUrd-Bereich festzustellen, die erst nach Ablauf der siebten Stunde der S-Phase stark abfällt. Nach Ablauf der siebten Stunde ist die Hybridisierung im schweren Bereich des Gradienten nur noch gering.

Bei den Hybridisierungskurven treten auch hier fast ausschließlich die mehrgipfeligen Peaks in der Haupt-DNA-

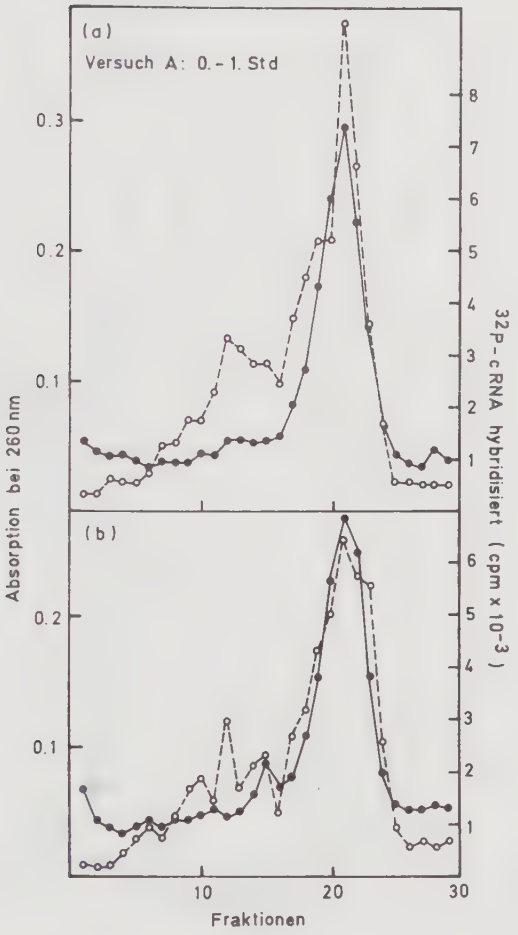

Abbildung 12.1 - 12.10:

Hybridisierung von HeLa-DNA, die in aufeinanderfolgenden 1-Stunden-Intervallen während der S-Phase mit 5-Bromdesoxyuridin markiert wurde, gegen ^{32}P-markierte cRNA von dem Seeigel-Histongen-Insert des Plasmids pCO2 bzw. der Plasmide psp 2 und psp 17 - Versuch A -. Zehn 200 ml-Kulturen wurden in aufeinanderfolgenden 1-Stunden-Intervallen nach dem Entlassen aus dem Hydroxyharnstoff-Doppelblock mit 10 µM 5-Bromdesoxyuridin markiert. Im Anschluß an jedes Markierungs-

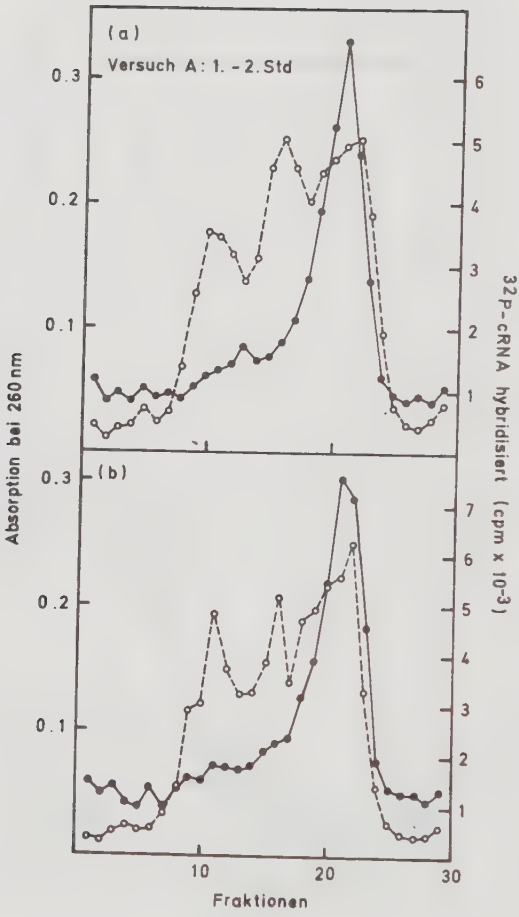

Abbildung 12.2

intervall wurde die DNA isoliert. Mit der DNA eines jeden Markierungsintervalles wurden zwei CsCl-Dichtegradienten mit 33000 rpm über 65 Std. bei 25°C in einem Festwinkelrotor gefahren. Die Auftragsmenge pro Gradient lag bei 80 µg DNA. Die Gradienten wurden in 29 Fraktionen gesammelt und die Absorption der einzelnen Fraktionen bei 260 nm bestimmt (• ——•). Nach Fixierung der einzelnen Fraktionen auf Nitrocellulose-Filtern wurden sie gegen ^{32}P-markierte cRNA von Seeigel-

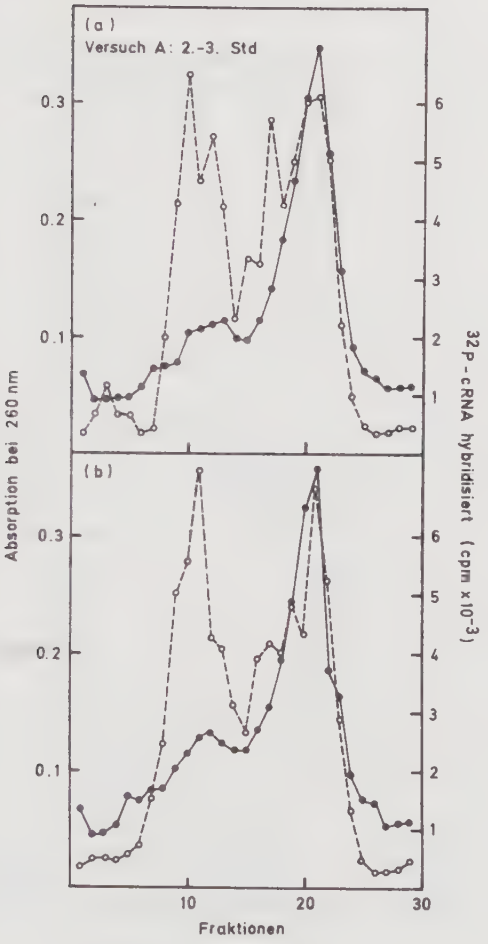

Abbildung 12.3

Histon-DNA hybridisiert (o---o). Die Hybridisierungslösung enthielt jeweils 5 x 10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung. Die Hybridisierungen wurden durchgeführt wie unter Abbildung 7 beschrieben. Der jeweilige Leerfilterwert wurde von den einzelnen Werten abgezogen.

Die BrdUrd-substituierte DNA bandiert zwischen den Fraktionen 8 und 15.

(a) und (b) sind jeweils Duplikate.

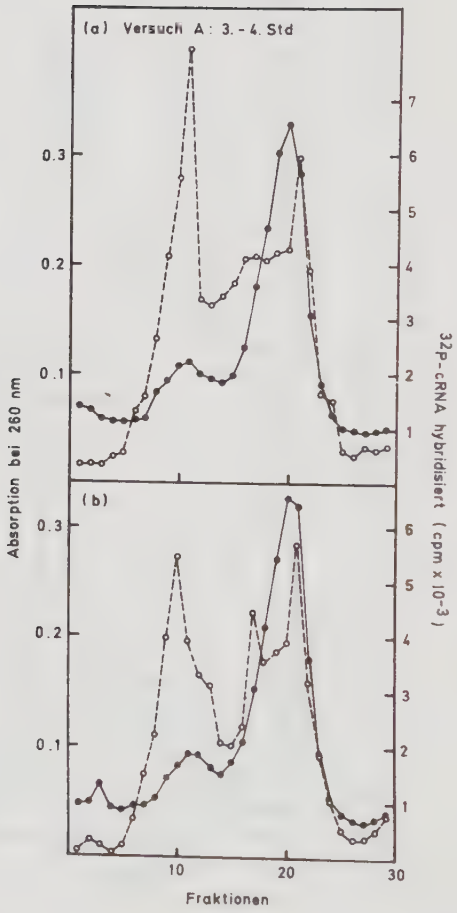

Abbildung 12.4

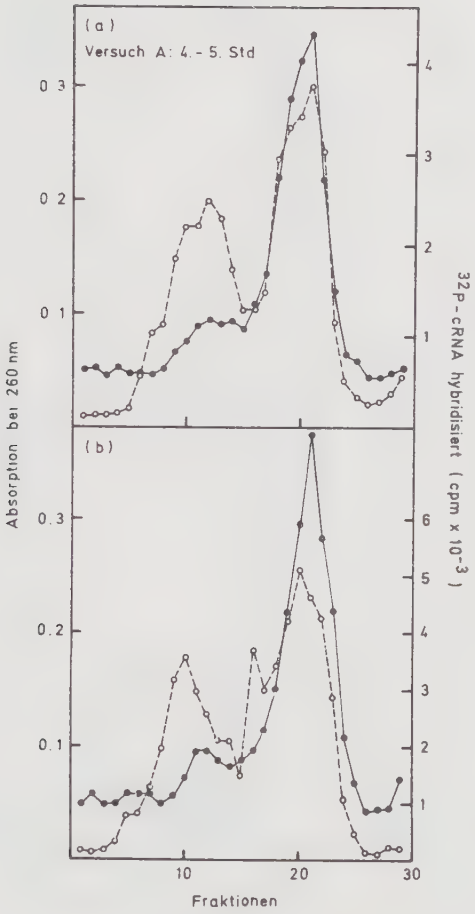

Abbildung 12.5

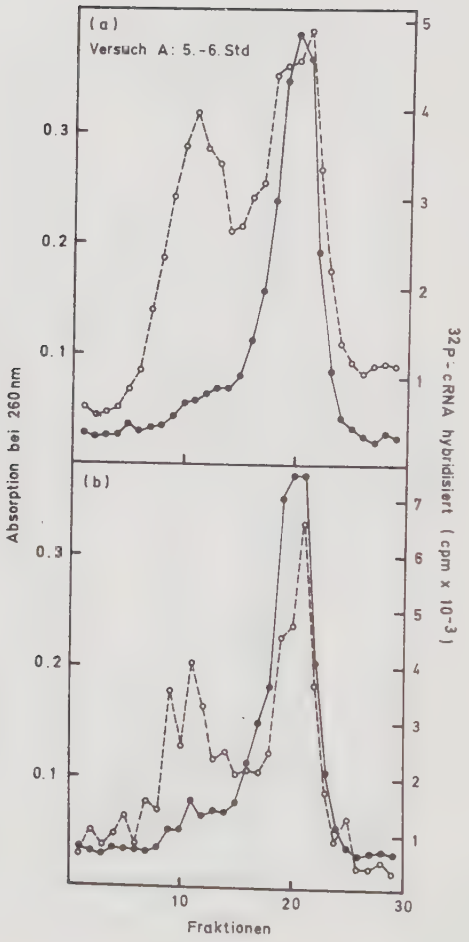

Abbildung 12.6

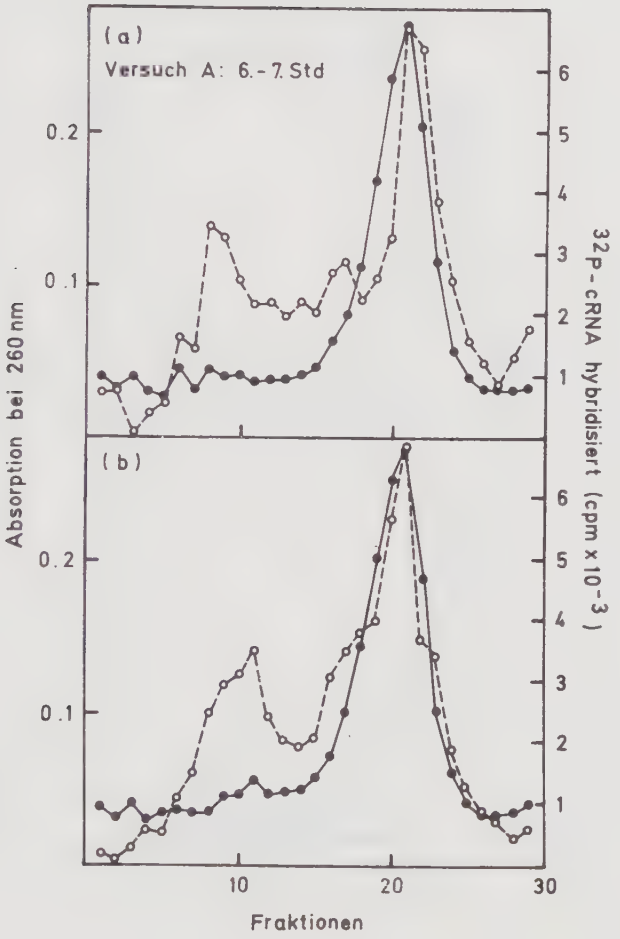

Abbildung 12.7

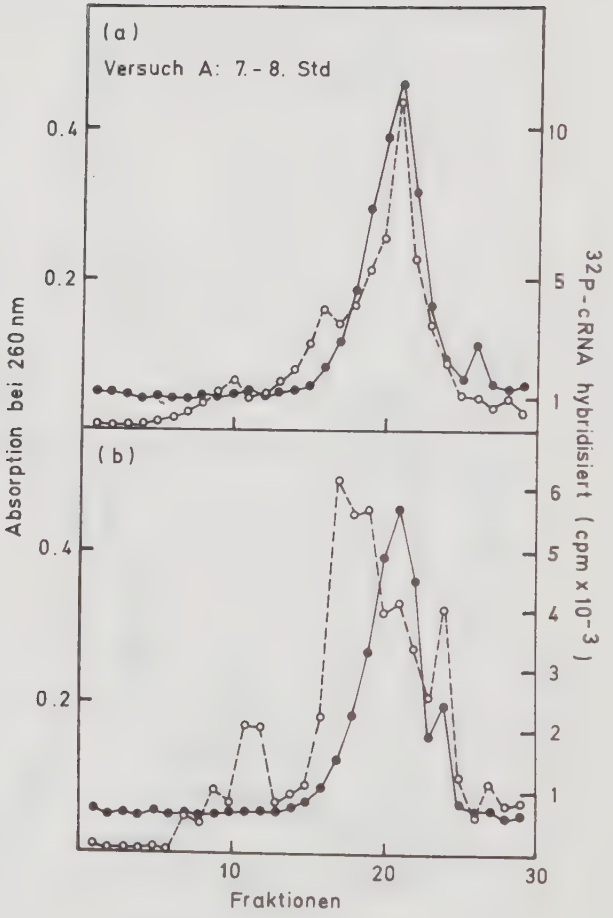

Abbildung 12.8

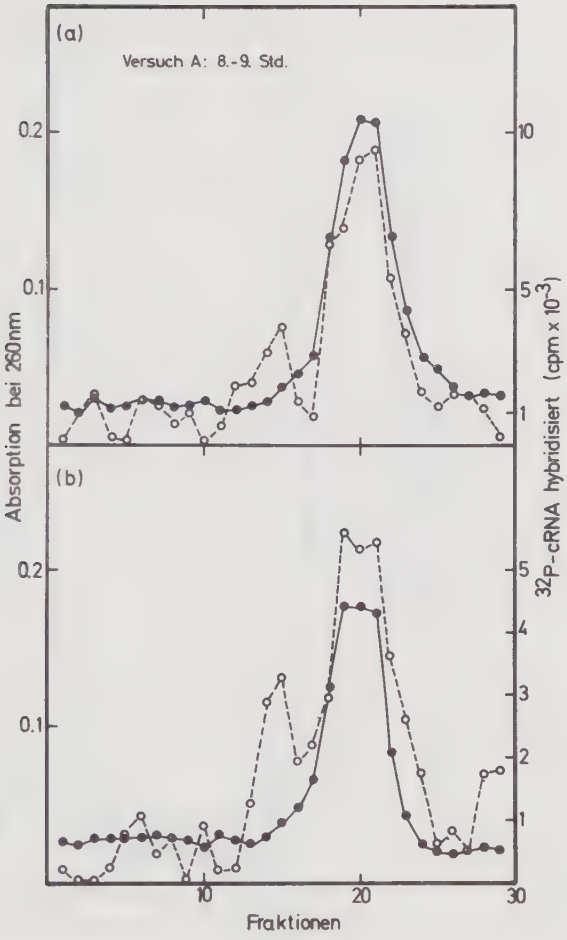

Abbildung 12.9

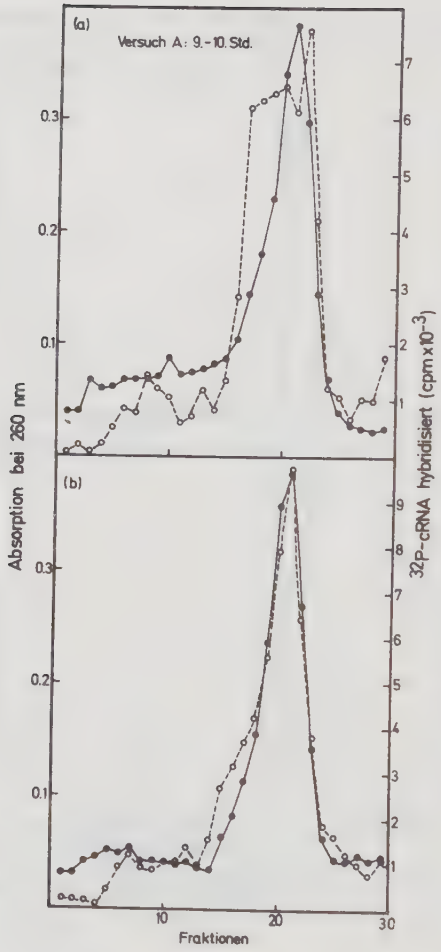

Abbildung 12.10

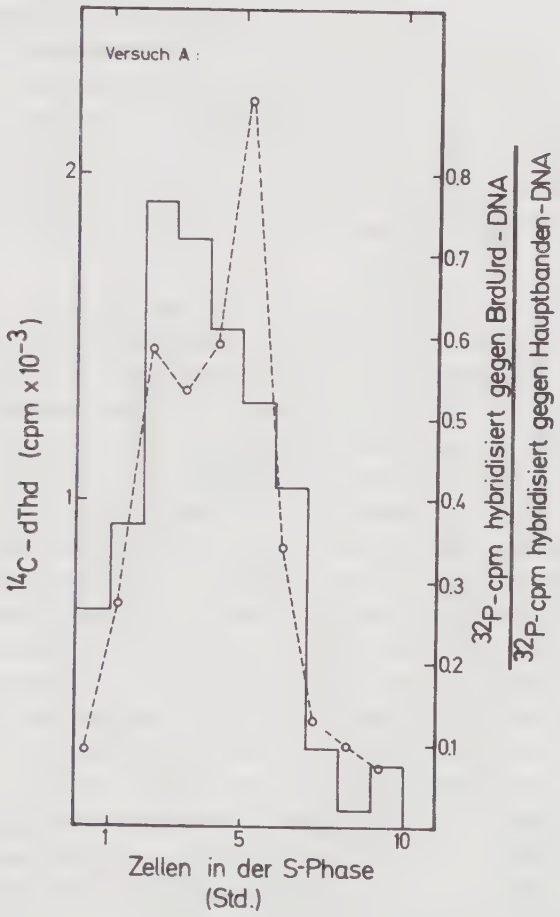

Abbildung 13:

Versuch A. Verlauf der Replikation der Histongene in HeLa-Zellen während der S-Phase im Vergleich zu der gesamten DNA-Synthese während dieses Zeitraums. Die DNA-Synthese wurde wie unter Abbildung 1 beschrieben durch den Einbau von ^{14}C-Thymidin in säurefällbares Material verfolgt (o---o). Der Verlauf der Replikation der Histongene wurde wiedergegeben durch die Bestimmung des Verhältnisses der Summe der hybridisierten Radioaktivität im BrdUrd-enthaltenden DNA-Bereich zu der Summe der hybridisierten Radioaktivität in der Haupt-DNA-Bande.

Bande auf, wobei ein Teil der hybridisierbaren Radioaktivität deutlich zum schwereren Bereich hin verschoben ist. Wie aber aus den Hybridisierungskurven mit unmarkierter HeLa-DNA zu ersehen ist, wo der Verlauf ähnlich war, müssen bei der Auswertung der Hybridisierungskurven diese in die schwereren Bereiche der Gradienten verschobenen Anteile der hybridisierenden Radioaktivität eindeutig der Haupt-DNA-Bande zugeordnet werden.

Summiert man die im Bereich der neu-replizierten DNA auftretende hybridisierte Radioaktivität und setzt sie in Beziehung zu der Summe der Hybridisierungsaktivität in der Haupt-DNA-Bande, dann ergibt sich der in einem Säulendiagramm in Abbildung 13 dargestellte Verlauf. In der Abbildung ist ebenfalls die Thymidin-Einbaukurve gezeigt. Es ist aus dieser Darstellung zu erkennen, daß die Replikation der Histongene während der gesamten Dauer der S-Phase stattzufinden scheint, daß aber das Maximum der Replikation dieser Gene vor Erreichen des DNA-Synthese-Peaks liegt. Unter Nichtberücksichtigung der Werte für die beiden letzten Markierungsintervalle, wo die Bestimmung des Verhältnisses zwischen der Hybridisierungsaktivität im BrdUrd-Bereich und der in der Haupt-DNA-Bande nicht ganz eindeutig erfolgen konnte, kann man berechnen, daß etwa 40% der Histon-codierenden Sequenzen im Zeitraum zwischen der zweiten und vierten Stunde der S-Phase repliziert werden, während weitere 30% der Histongen-Replikation auf den Zeitraum der maximalen DNA-Synthese zwischen der vierten und sechsten Stunde entfallen.

Der zeitliche Verlauf der Replikation insgesamt zeigt aber auch, daß die unter der Annahme einer geclusterten Organisationsform der Histongene, wie sie in Seeigeln und Drosophila besteht, zu vermutende gemeinsame, auf einen kurzen Zeitraum begrenzte Replikation dieser Gene nicht zutrifft.

Der Versuch B zeigt das gleiche Ergebnis. Wie aus den Abbildungen 14.1 - 14.10 zu ersehen ist, erreicht die Hybridisierung für den neu-replizierten DNA-Bereich auch hier

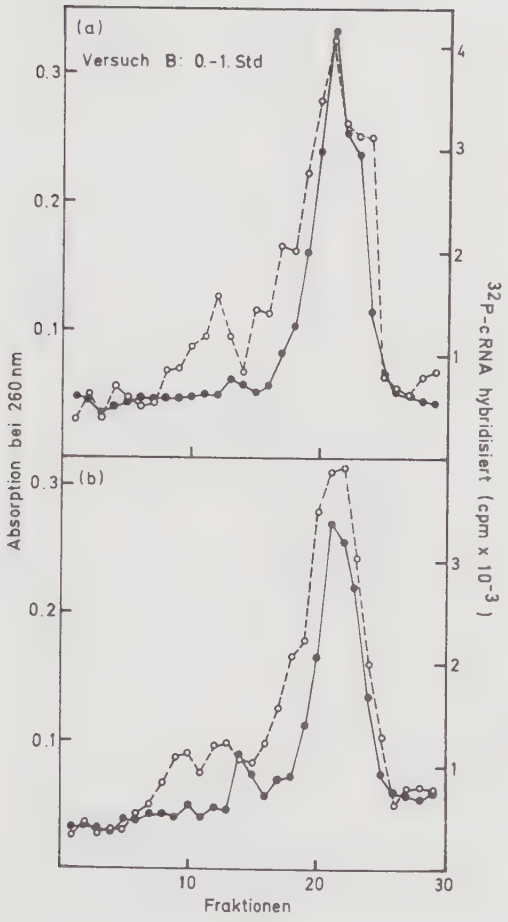

Abbildung 14.1 - 14.10:

Versuch B. Siehe Legende zur Abbildung 12

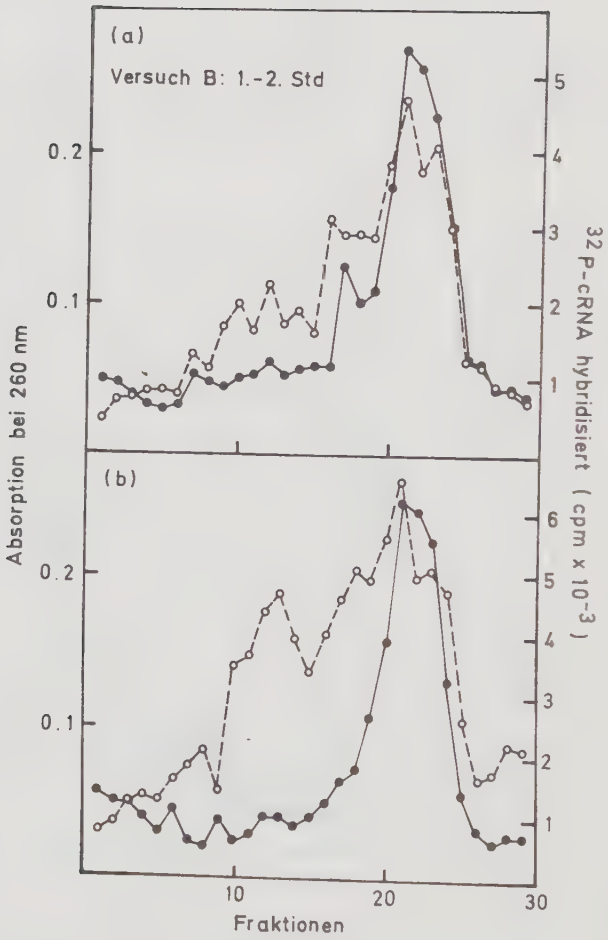

Abbildung 14.2

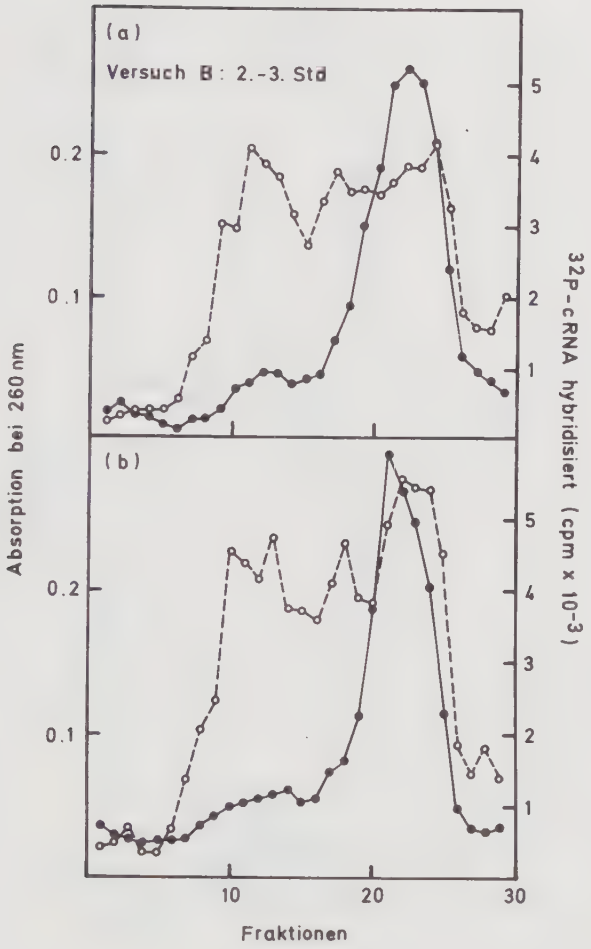

Abbildung 14.3

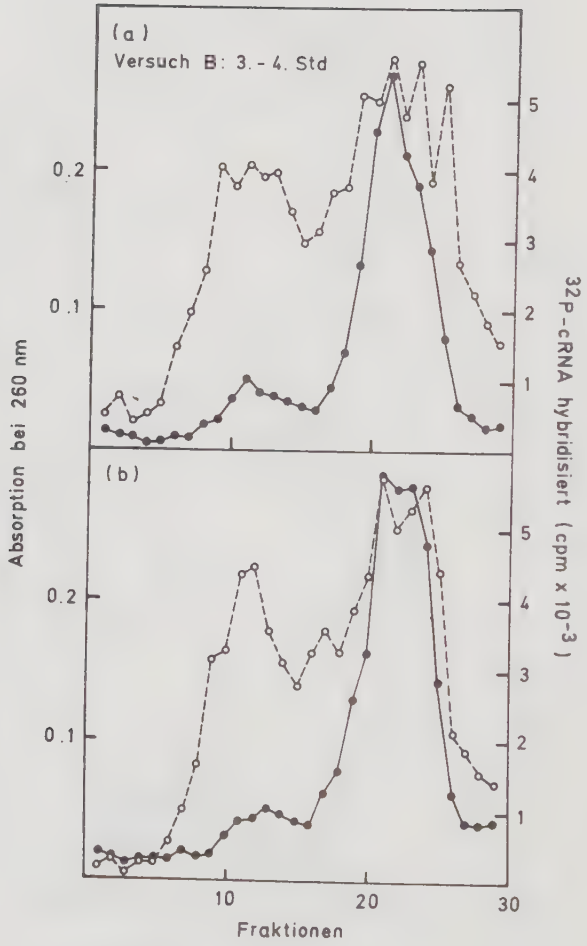

Abbildung 14.4

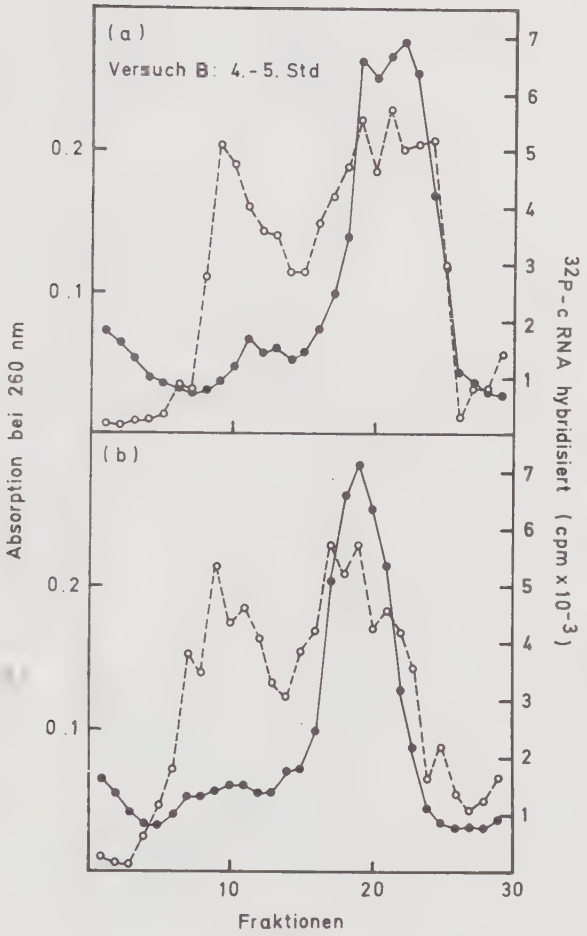

Abbildung 14.5

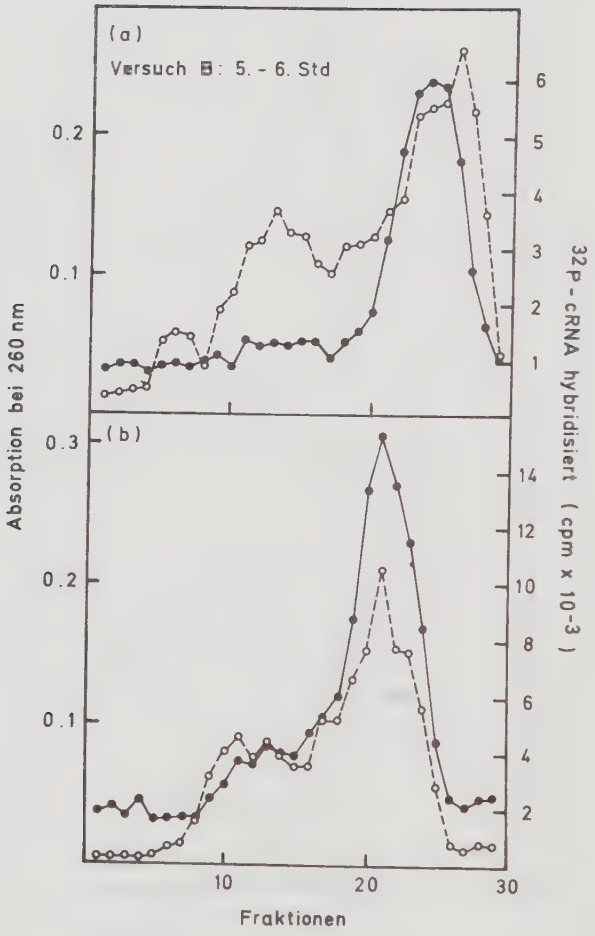

Abbildung 14.6

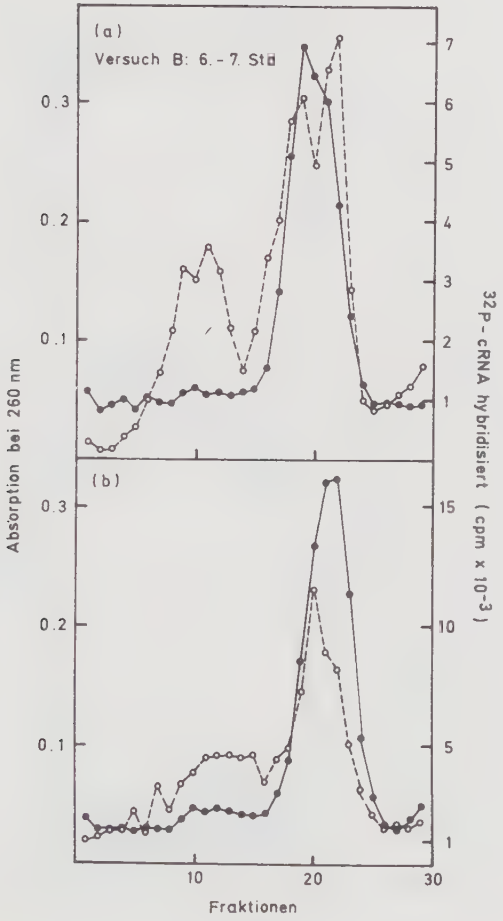

Abbildung 14.7

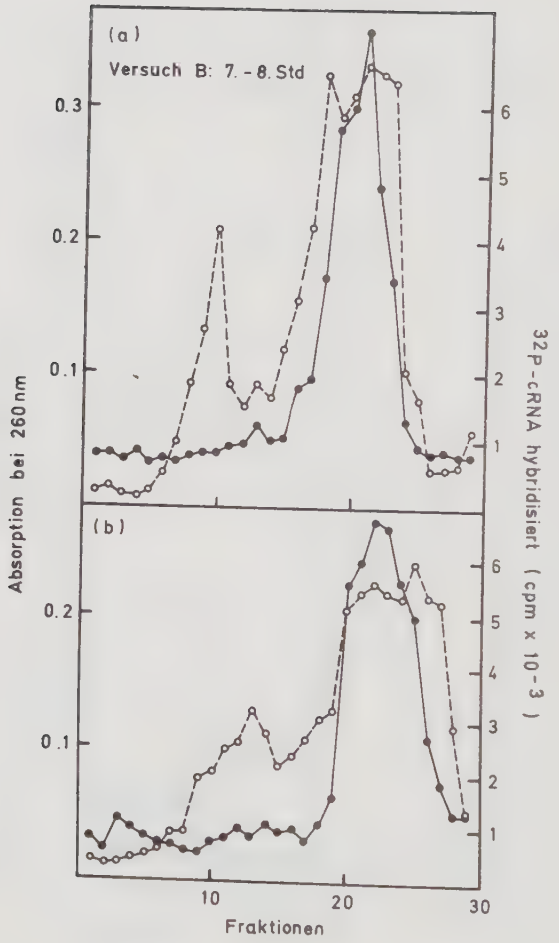

Abbildung 14.8

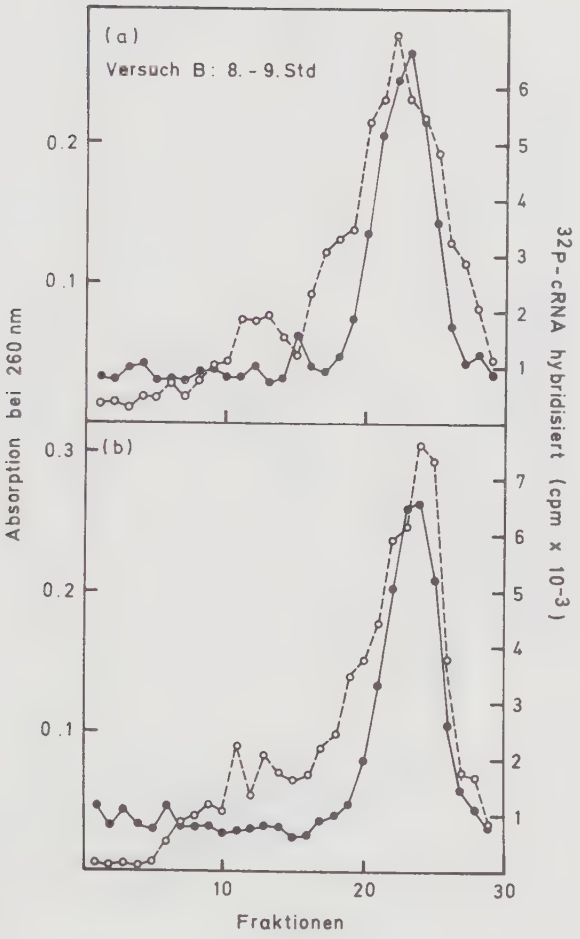

Abbildung 14.9

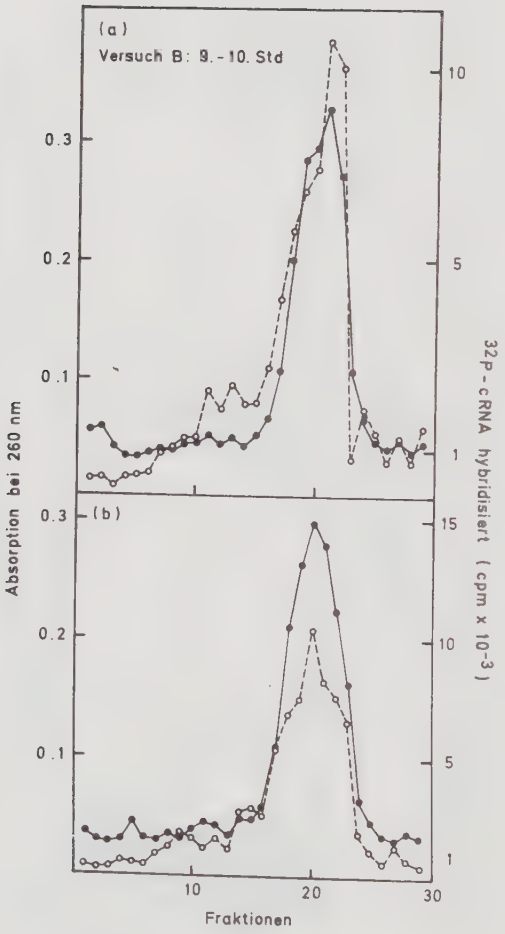

Abbildung 14.10

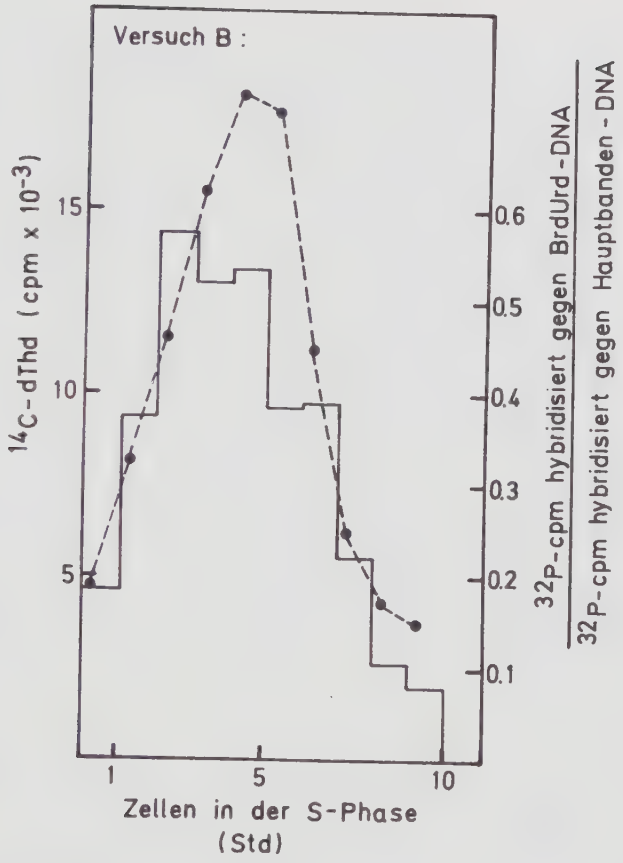

Abbildung 15:

Versuch B. Siehe Legende zur Abbildung 13.

zwischen der zweiten und dritten Stunde ein Maximum, dieses Niveau wird allerdings in leicht abgeschwächtem Maß bis zum Ende der fünften Stunde beibehalten, um dann doch stärker abzufallen. Für die letzten beiden Markierungsintervalle ist eine eindeutige Zuordnung an Hybridisierungsaktivität zum Bereich der neu-replizierten DNA wiederum problematisch. Für den Versuch B ergibt sich somit eine nicht so eindeutige Verschiebung eines Teils der Replikation der Histongene in einen Zeitraum vor dem Maximum der DNA-Synthese. Das ist besonders gut im Diagramm der Abbildung 15 zu erkennen. Diese Abbildung gibt das Verhältnis der Summe der Hybridisierungsaktivität im BrdUrd-Bereich zur Summe der Hybridisierungsaktivität in der Haupt-DNA-Bande in einem Säulendiagramm in Verbindung mit der DNA-Synthesekurve wieder.

Es wurden auch in diesem Experiment zwischen der zweiten und vierten Stunde der S-Phase also vor dem Maximum der DNA-Synthese etwa 35% der Histongene repliziert. Etwa 29% dieser Gene wurden im Zeitraum der maximalen DNA-Synthese zwischen der vierten und sechsten Stunde repliziert.

Wie schon erwähnt, zeigt auch hier das Auftreten von Hybridisierung im Bereich der neu-replizierten DNA innerhalb eines jeden Markierungsintervalles (mit Ausnahme der letzten beiden), daß die Replikation der Histongene nicht auf einen scharf begrenzten Zeitpunkt innerhalb der S-Phase von HeLa-Zellen beschränkt zu sein scheint. Die Replikation dieser Gene setzt ein in der zweiten Stunde der S-Phase und ca. 40% dieser Gene sind bereits vor dem Erreichen des Maximums der DNA-Synthese repliziert. Weiterhin ist bemerkenswert, daß in beiden Versuchen schon in der ersten Stunde der S-Phase Replikation Histon-spezifischer Sequenzen festzustellen ist, in einem Zeitraum also, wo die Histongene auch für die Transcription zur Verfügung stehen (Breindl und Gallwitz, 1973).

3.4. Hybridisierung von Restriktionsfragmenten von HeLa- und Placenta-DNA gegen komplementäre RNA (cRNA) von Seeigel-Histongen-DNA

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um einen Einblick in die Organisationsform der Histongene in menschlicher DNA zu erhalten. Nach Verdauung mit Restriktionsenzymen war gezeigt worden, daß manche dieser Enzyme nur eine oder wenige Schnittstellen in der gesamten Histongen-Repeat-Einheit von Seeigeln (Kedes et al., 1975b) und Drosophila (Lifton et al., 1977) haben. So schneidet Hind III nur einmal, Eco R1 zweimal in der Repeat-Einheit von Strongylocentrotus purpuratus (s. Abbildung 5). Das Auftreten einer oder weniger definierter Hybridisierungsbanden nach Verdauung mit diesen Restriktionsenzymen würde bei der Verwendung von cRNA der gesamten Seeigel-Histongen-Repeat-Einheit als Hybridisierungsprobe für eine ähnliche Anordnung der menschlichen Histongene sprechen.

Mit der von Southern (1975) entwickelten Methode, DNA-Fragmente von Agarose-Gelen auf Nitrocellulose-Filter zu übertragen und sie somit der Hybridisierung zugänglich zu machen, können in restriktionsverdauter DNA bestimmte spezifische DNA-Sequenzen durch Hybridisierung identifiziert werden.

HeLa- und Placenta-DNA wurden mit den Restriktionsenzymen Eco R1, Hind III, Bam I und Pst I komplett verdaut und jeweils 1,5 bis 2,0 µg der DNA auf einen 0,9%igen Agarose-Plattengel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Vielzahl der entstehenden DNA-Banden, die mit Ethidiumbromid angefärbt wurden, führen zu einem Schmier über die gesamte Trennstrecke des Gels (Abbildung 16 und 18). Nur im niedermolekularen Bereich (kleiner als die mit einem Molekulargewicht von $2{,}09 \times 10^6$ Daltons am schnellsten wandernde Bande der mit dem Restriktionsenzym Eco R1 geschnittenen Lambda-DNA) sind definierte Banden zu erkennen, die ungeschnittene DNA (Spur 3 und 8) zeigt eine fast einheitliche Bande. Zum Nachweis der vollständigen Verdauung wurde ein Gemisch von HeLa-, Placenta- und Lambda-DNA mit Eco R1 verdaut. Nach

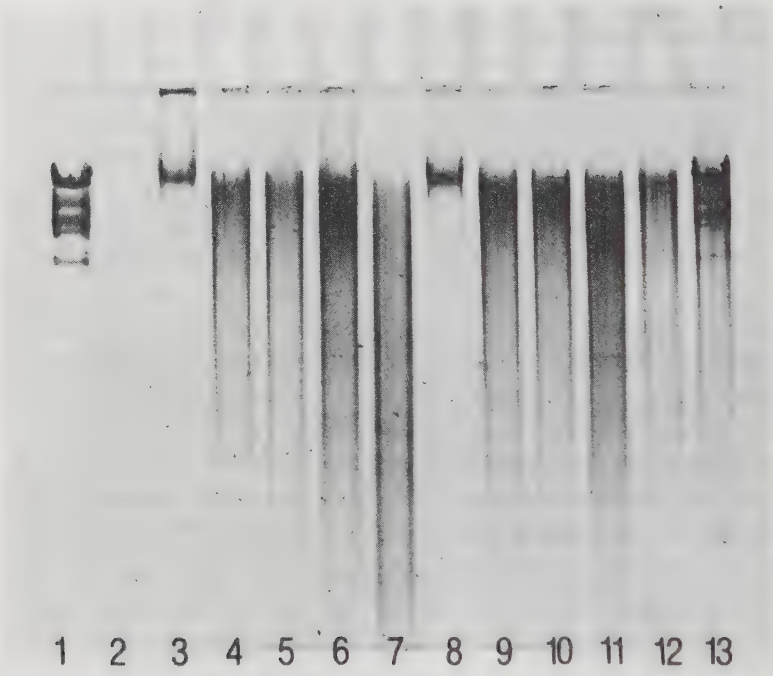

Abbildung 16:

Auftrennung von mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnittener Gesamt-HeLa- und -Placenta-DNA auf Agarosegelen. Jeweils 5 µg DNA wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen über mindestens 5 Std. verdaut. Nach einer Chloroform-Isoamylalkoholextraktion wurden die wäßrigen Phasen gefällt und in jeweils 20 µl eines Aufnahmepuffers (5% Glycerin, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylene Cyanole FF) gelöst. Jeweils 6 µl wurden auf ein 0,9%iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde bei 60 V konstant über 5 Std. gefahren und anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt.

Spur 1: Lambda-DNA mit Eco R1 geschnitten - Marker -
Spur 2: gereinigter Histongen-Insert des Plasmids pCO2 mit Eco R1 geschnitten
Spur 3: ungeschnittene menschliche Placenta-DNA - Auftrag: 0,5 µg
Spur 4 und 5: Placenta-DNA mit Eco R1 geschnitten
Spur 6: Placenta-DNA mit Hind III geschnitten
Spur 7: Placenta-DNA mit Bam 1 geschnitten
Spur 8: ungeschnittene HeLa-DNA - Auftrag: 0,5 µg
Spur 9 und 10: HeLa-DNA mit Eco R1 geschnitten
Spur 11: HeLa-DNA mit Hind III geschnitten
Spur 12: HeLa-DNA mit Bam 1 geschnitten
Spur 13: Gemisch von Lambda-, Placenta- und HeLa-DNA mit Eco R1 geschnitten

Abbildung 17:

Autoradiogramm der Hybridisierung der auf Nitrocellulose-Filter transferierten DNA der Abbildung 16 gegen eine ^{32}P-markierte cRNA von dem Seeigel-Histongen-Abschnitt des Plasmids pCO2. Die Hybridisierungslösung enthielt 30 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,6 M NaCl, 50% Formamid, 0,2% SDS und 500 µg/ml E.coli-tRNA. An Radioaktivität wurden eingesetzt 4-5 x 10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung. Die Hybridisierung wurde über 24 Stunden bei 40°C durchgeführt. Der sich anschließende Waschvorgang enthielt eine RNAase A-Behandlung mit 50 µg RNAase A/ml. Nach dem Trocknen des Filters wurde es für 14 Tage unter einen Röntgenfilm gelegt.

Abbildung 18:

Siehe Legende zur Abbildung 16.

Spur 1: Lambda-DNA mit Eco R1 geschnitten - Marker -
Spur 2: Plasmid pCO2, das partiell mit Hind III geschnitten wurde
Spur 3: ungeschnittene menschl. Placenta-DNA - Auftrag: 0,5µg
Spur 4: Placenta-DNA mit Eco R1 geschnitten
Spur 5: Placenta-DNA mit Hind III geschnitten
Spur 6: Placenta-DNA mit Bam 1 geschnitten
Spur 7: Placenta-DNA mit Pst geschnitten
Spur 8: ungeschnittene HeLa-DNA - Auftrag: 0,5µg
Spur 9: HeLa-DNA mit Eco R1 geschnitten
Spur 10: HeLa-DNA mit Hind III geschnitten
Spur 11: HeLa-DNA mit Bam 1 geschnitten
Spur 12: HeLa-DNA mit Pst geschnitten
Spur 13: Gemisch von Lambda-, Placenta- und HeLa-DNA mit Eco R1 geschnitten

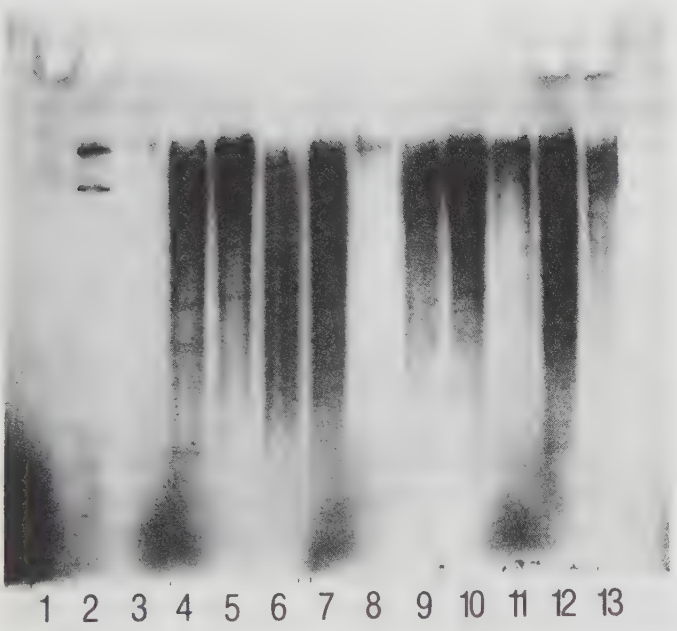

Abbildung 19:

Autoradiogramm der Hybridisierung der auf Nitrocellulose-Filter transferierten DNA der Abbildung 18 gegen eine ^{32}P-markierte cRNA von dem Plasmid pTS 306. Die Hybridisierungsbedingungen waren identisch mit den unter Abbildung 17 beschriebenen. Das Filter lag für 14 Tage unter einem Röntgenfilm.

Trennung in Agarose-Gelen ergibt Lambda-DNA fünf typische Fragmente (Abbildung 16 und 18, Spur 13). Die jeweils auf Spur 2 aufgetragene Histon-DNA des Seeigels S. purpuratus - im Fall der Abbildung 16 der mit Eco RI geschnittene Histongen-Insert des Plasmids pCO2 und bei dem Gel der Abbildung 18 das partiell mit Hind III geschnittene Plasmid pCO2 -, die als Marker-DNA für die Autoradiographie dienen sollte, wurde in nur so geringer Menge aufgetragen, daß sie auf dem Gel nicht sichtbar wurde. Da später bei der Hybridisierung entweder eine homologe Reaktion für den Fall der cRNA vom Histongen-Insert des Plasmids pCO2 oder eine Kreuz-Hybridisierung zwischen zwei Seeigel-Spezies im Fall der cRNA des Plasmids pTS 306 vorlag, war die auf das Gel aufgetragene und durch Ethidiumbromid nicht anfärbbare Menge für eine erfolgreiche Hybridisierung und die damit verbundene Schwärzung des Röntgenfilms ausreichend.

Die Hybridisierung der denaturierten und auf Nitrocellulose-Filter transferierten DNA ergab im Fall der Hybridisierung gegen die cRNA vom Histongen-Insert des Plasmids pCO2 (Abbildung 17) mehrere schwach auftretende Hybridisierungsbanden, die bedingt durch die relativ schlechte Kreuz-Hybridisierung zwischen menschlicher DNA und Seeigel-Histongen-cRNA erst nach einer 14-tägigen Exponierungszeit des Röntgenfilms auftraten. Wie die Abmessung des Abstandes zwischen dem Auftragspunkt und diesen Banden ergab, decken sich diese Hybridisierungsbanden teilweise mit denen, die bei der Hybridisierung dieser auf Nitrocellulose-Filter transferierten DNA gegen die cRNA des Plasmids pTS 306 und somit gegen das evolutionär stabilste Histonprotein H4 auftreten (Abbildung 19). Dies konnte gezeigt werden für die mit dem Restriktionsenzym Eco RI (Abbildung 17, Spur 4, 5, 9 und 10; Abbildung 19, Spur 4 und 9) und Hind III (Abbildung 17, Spur 6 und 11; Abbildung 19, Spur 5 und 10) verdaute DNA. Für die mit dem Restriktionsenzym Bam I verdaute DNA war eine derartige Zuordnung aufgrund der schwachen Hybridisierung nicht möglich.

Wie schon erwähnt, besteht Linearität zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten in Agarose-Gelen

und ihrem Molekulargewicht nur in einem begrenzten Molekulargewichtsbereich. Sie ist weiterhin abhängig von der Stromstärke. Eine eindeutige Größenbestimmung dieser Fragmente durch den Vergleich mit Marker-DNA bekannter Größe auch beim Anlegen der hier eingestellten konstanten Spannung von 60 V konnte nicht vorgenommen werden. Die in einem Schmier von Radioaktivität sichtbaren Hybridisierungsbanden liegen jedoch in dem Bereich des mit 1,7 kb kleineren Eco RI-Fragments des Plasmids pCO2 oder sind kleiner als dieses Fragment und haben daher nicht die Größe, die von einer gesamten Histongen-Repeat-Einheit erwartet wird.

Das Auftreten von gemeinsamen Hybridisierungsbanden allerdings sowohl bei der Hybridisierung gegen die gesamte Histongen-Repeat-Einheit als auch bei der Hybridisierung gegen ein einzelnes Histongen deutet daraufhin, daß sich das H4-Histongen in unmittelbarer Nähe der anderen Histongene befindet, so daß auch für HeLa- und Placenta-DNA eine geclusterte Organisationsform der Histongene als möglich erscheint.

Das Auftreten mehrerer Hybridisierungsbanden könnte bedeuten, daß eine Heterogenität hinsichtlich der Länge und Sequenz dieser Histongen-Abschnitte auch bei HeLa- und Placenta-DNA besteht. Eine unterschiedliche Verteilung und Anwesenheit von Restriktionsschnittstellen würde diese Heterogenität zeigen. Im Gegensatz zu den hier gefundenen Daten konnte bei Seeigel und Drosophila eine dominierende Haupthybridisierungsbande für ein durch ein bestimmtes Restriktionsenzym hervorgerufenes Verdauungsmuster gefunden werden.

IV. Diskussion

Das Ziel der Arbeit war es, den Zeitpunkt der Replikation der Histongene während der S-Phase von HeLa-Zellen zu bestimmen. Da die Histongene auch in menschlichen Zellen reiteriert sind (Wilson und Melli, 1977), ist ihre Organisationsform und Anordnung im Genom bei dieser Fragestellung eventuell von Bedeutung. Diese wurde deshalb weiterhin untersucht.

Präzise Aussagen über das Replikationsmuster bestimmter DNA-Abschnitte sind abhängig von einer perfekten Synchronisierung der Zellen, um einen möglichst hohen Prozentsatz an Zellen zu erreichen, die gleichzeitig die S-Phase durchlaufen. Die durchgeführte Synchronisierung mit der Unterbrechung der DNA-Synthese in zwei aufeinander folgende Zellzyklen mit Hydroxyharnstoff erbrachte eine etwa 80%ige Synchronisierung. Somit war zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung noch ein gewisser Prozentsatz von Zellen an verschiedenen Punkten der S-Phase. Wie aber der Verlauf der Hybridisierungskurven (Abb. 12 und 14) mit im Vergleich zu den Peak-Fraktionen niedrigen Hintergrundswerten zeigt, wirkte sich dieser Anteil nicht als störend aus. Die beobachtete Verdoppelung der Zellen nach Durchlaufen der S- und G2-Phase innerhalb einer halben bis einer Stunde deutet weiterhin auf eine gute Synchronisierung hin. Die erreichten Werte sind auch vergleichbar mit den publizierten Daten, die das Abschütteln von Mitosezellen zur Synchronisierung einsetzen. So brachten auch die Untersuchungen über die Histon-mRNA-Synthese, die mit der DNA-Synthese synchron verläuft, sowohl mit Mitosezellen (Stein et al., 1975) als auch mit Hydroxyharnstoff oder Thymidin synchronisierten Zellen (Breindl und Gallwitz, 1973) die gleichen Ergebnisse. Die Synchronisierung sollte somit ausreichend gut sein, um Aussagen über das Replikationsmuster der Histongene während der S-Phase von HeLa-Zellen machen zu können.

Die zur Bestimmung des Replikationszeitpunktes der Histongene ausgewählten Hybridisierungsexperimente sollten

idealerweise mit einer homologen Probe durchgeführt werden, das heißt mit einer markierten HeLa-Histon-mRNA oder einer zu dieser mRNA komplementären cDNA. Da eine solche Probe aber bis jetzt noch nicht zur Verfügung steht, wurden die Histongene aus Seeigeln, die in E.coli cloniert worden sind, zur Hybridisierung herangezogen. Da die Histone evolutionär stabile Proteine sind, war eine genügend große Sequenzhomologie auch der Gene von Seeigel und Mensch zu erwarten. In der Tat zeigten Kedes und Birnstiel (1971) und Farquar und McCarthy (1973), daß die Histon-mRNA von Seeigeln mit DNA verschiedenster Spezies, Insekten und Säugern, kreuz-hybridisiert. Das Ausmaß der Kreuz-Hybridisierung ist allerdings unterschiedlich groß und von Spezies zu Spezies verschieden. Für Maus- bzw. Küken-DNA ergab sich durch den Vergleich der thermischen Stabilität der gebildeten Hybride mit Seeigel-Histon-mRNA und der Ausbeute an hybridisierter radioaktiv markierter RNA gegenüber der homologen Hybridisierungsreaktion eine Effizienz von 10% (Farquar und McCarthy, s.o.).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Kreuz-Hybridisierungen zwischen HeLa-DNA und Seeigel-Histongen-cRNA mit einer linearen Abhängigkeit von der eingesetzten cRNA-Menge (s. Abb. 7) deuten auch auf eine ausreichende Spezifität hin. Es kann aber nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß z.B. Polypurin- oder Polypyrimidin-Sequenzen in der Spacer-DNA der Histongene von Seeigeln mit ähnlichen Sequenzen in menschlicher DNA hybridisieren. So befindet sich z.B. am 5'-Ende vom H4-Gen des Seeigels Ps. miliaris ein Poly-C-Stück (Schaffner et al., 1978), das möglicherweise unspezifisch mit menschlicher DNA hybridisieren könnte. Der Verlauf der Schmelzkurve des Hybrids zwischen HeLa-Histon-mRNA und Seeigel-Histon-DNA (Melli et al., 1977) weist andererseits gerade im Vergleich zu gleichen Werten, die man bei der Kreuz-Hybridisierung mit Drosophila-DNA und Seeigel-Histon-mRNA erhält, doch auf eine ausreichende Spezifität dieser Kreuz-Hybridisierungsreaktion hin.

Die Kreuz-Hybridisierung von HeLa-DNA und pBR 322-DNA, die gering die durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese ge-

reinigte Histon-DNA verunreinigt, war, wie aus Tabelle 1 zu ersehen, so gering, daß sie ausgeschlossen werden konnte.

Die Bestimmung des Replikationsmusters der Histongene in HeLa-Zellen in Verbindung mit daraus eventuell möglichen Aussagen über deren Organisationsform hat hier kein klares Ergebnis gebracht. Das Auftreten eines zeitlich eng begrenzten Replikationszeitraumes für eine bestimmte Genklasse, was durch eine geclusterte Organisationsform dieser Genklasse begünstigt werden könnte, konnte für die Replikation der Histongene in HeLa-Zellen nicht gezeigt werden. Vielmehr erstreckt sich die Replikation in beiden durchgeführten Versuchen über die Dauer der gesamten S-Phase, wobei die Replikation nicht mir der DNA-Synthese insgesamt synchron verläuft, sondern ihre maximalen Werte zwischen der zweiten und vierten Stunde der S-Phase erreicht, während die DNA-Synthese ihr Maximum erst zwischen der vierten und sechsten Stunde erreicht. Damit ist eine gewisse Polarisierung der Histongenreplikation in HeLa-Zellen in die erste Hälfte der S-Phase gegeben, was hinsichtlich des G+C-Reichtums der Histon-codierenden Sequenzen mit dem Replikationsmuster übereinstimmen würde, daß G+C-reiche Sequenzen früh und A+T-reiche Sequenzen spät in der S-Phase repliziert werden.

Wären die reiterierten Histongene in menschlichen Zellen auf einem chromosomalen Ort lokalisiert, dann wäre ihre Replikation zu einem eng begrenzten Zeitraum sehr wahrscheinlich. Nimmt man eine ungefähre Länge der vermuteten Histongen-Repeat-Einheiten von 6 kb (Hackett et al., 1978) in HeLa-Zellen an, dann würde bei einer 30- bis 40-fachen Reiteration dieser Gene (Wilson und Melli, 1977) in geclusterter Form ihre Replikation nur etwa 30 bis 40 Minuten dauern, wenn der Histongen-Cluster nur einen Replikations-Origin hätte. Dieser Kalkulation liegt die von Huberman und Riggs (1968) und Painter und Schaefer (1971) bestimmte durchschnittliche Replikationsgeschwindigkeit von etwa 1 um/min (= 6×10^3 Nukleotide/min) zugrunde. Die Replika-

tion der Histongene könnte allerdings noch schneller verlaufen, lägen in den hintereinandergeschalteten Repeat-Einheiten, die hier angenommen werden, mehrere Replikations-Origins vor.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, daß ein Teil der menschlichen Histongene hintereinandergeschaltet sein könnte. Dies wurde auch von Yu et al. (1978) durch Hybridisierung von angereicherter HeLa-Histon-mRNA gegen Metaphasenchromosomen gefunden. Es scheint darüberhinaus Histongene an anderen Orten zu geben.

Schlüsse auf die Organisationsform der menschlichen Histongene können allerdings aus der Hybridisierung von restriktionsverdauter HeLa- und Placenta-DNA gegen die cRNA der gesamten Seeigel-Histongen-Repeat-Einheit und gegen die cRNA des Seeigel-H4-Histongens gezogen werden. Die bei beiden Hybridisierungen auftretenden gemeinsamen Hybridisierungsbanden deuten daraufhin, daß sich das H4-Histongen in unmittelbarer Nähe der anderen Strukturgene befindet. Dies läßt den Schluß zu, daß auch in HeLa-Zellen eine geclusterte Organisationsform der Histongene vorliegen könnte.

Die Daten von Overton und Weinberg (1978), die in restriktionsverdauter Seeigel-DNA durch Hybridisierung gegen Histon-DNA-Sequenzen zeigen konnten, daß neben einer Haupthybridisierungsbande weitere Banden sichtbar waren, deuten auf eine Längen-Heterogenität der Histongen-Repeat-Einheiten hin. Bestätigt wurden diese Befunde auch durch das Auftreten mehrerer Hybridisierungsbanden in Drosophila. Hier konnte gezeigt werden, daß die Längenheterogenität auf die unterschiedliche Länge der Spacer-DNA innerhalb einer Histongen-Repeat-Einheit zurückzuführen war (Beschreibung bei Kedes, 1979). Das Auftreten mehrerer Hybridisierungsbanden auch bei menschlicher DNA könnte heißen, daß es auch hier, unter der Annahme einer geclusterten Organisationsform der Histongene, unterschiedlich große Cluster an Histongen-Repeat-Einheiten geben kann. Diese Unterschiede sind dann möglicherweise auf zusätzliche Sequenzen, die in die Spacer-DNA eingefügt wurden, zurückzuführen. Das Auftreten mehrerer Hybri-

disierungsbanden kann allerdings auch auf Sequenzunterschiede zurückzuführen sein, die dazu führen, daß neue spezifische Restriktionsschnittstellen geschaffen werden oder aber andere verloren gehen.

Die hier vorliegenden Hinweise auf eine geclusterte Organisationsform der Histongene auch in menschlichen Zellen haben dann allerdings auf die Replikation der Histongene in diesem Sinn keinen Einfluß, daß die Organisationsform Basis für einen zeitlich eingrenzbaren Replikationszeitpunkt sein könnte.

Die Möglichkeit, daß die auf den Autoradiogrammen auftretenden Hybridisierungsbanden wie auch die nach der Hybridisierung der DNA der CsCl-Dichtegradienten auftretende hybridisierende Radioaktivität auf unspezifische Hybridisierungsreaktionen zurückzuführen sind, wird durch zwei Argumente stark reduziert. Einmal stammen die zur Hybridisierung verwendeten cRNAs von Histon-DNA zweier verschiedener Seeigel-Spezies. Die im Plasmid pCO2 clonierte Histon-DNA stammt von dem Seeigel S-purpuratus, das im Plasmid pTS 306 clonierte H4-Gen aus dem Seeigel Ps. miliaris. Zwischen beiden Seeigel-Spezies gibt es Sequenzunterschiede besonders im Bereich der Spacer-DNA (Weinberg et al., 1972). Zum anderen zeichnet sich die in der gesamten Histongen-Repeat-Einheit auftretende Spacer-DNA durch ihren A+T-Reichtum aus, während die das H4-Gen direkt umgebenden 100 Nukleotide, die ebenfalls noch mitcloniert wurden, G+C-Reichtum aufweisen (Schaffner et al., 1978). Diese unterschiedliche Basenzusammensetzung der in der cRNA erscheinenden Spacer-Regionen macht eine unspezifische Hybridisierung, die zu gleichen Hybridisierungsbanden bzw. ähnlich verlaufenden Hybridisierungskurven führt, ziemlich unwahrscheinlich.

Weitere Hinweise auf eine Heterogenität auch in menschlichen Zellen ergeben sich aus dem Auftreten der mehrgipfeligen Hybridisierungspeaks, die sowohl bei HeLa- als auch bei Placenta-DNA gefunden wurden (s. Abb. 8, 9, 10 und 11). Eine Heterogenität der Histongen-Repeat-Einheiten ist wie bereits beschrieben sowohl im Seeigel- wie auch im Drosophila-

Genom bekannt. Diese Heterogenität bezieht sich in Seeigeln einmal auf die unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Newrock et al., 1978; Spinelli et al., 1979) aber auch auf Unterschiede innerhalb eines jeden Entwicklungsstadiums (Overton und Weinberg, s.o.). Verbunden mit der schon erwähnten Längenheterogenität auch bei Drosophila könnte dies für die Organisationsform der menschlichen Histongene heißen, daß mehrere Populationen an Histon-codierenden Sequenzen im Genom vorhanden sind. Diese können sich einmal, wie aus den Hybridisierungsexperimenten mit verdauter HeLa- und Placenta-DNA zu erkennen ist, in ihrer Größe unterscheiden. Die Heterogenität kann aber auch in der Basenzusammensetzung der Spacer-DNA, möglicherweise aber auch infolge synonymer Codons in der codierenden Sequenz bestehen. Unterschiede aber in dem A+T-Gehalt der nicht codierenden Regionen in diesen verschiedenen Histongen-Clustern könnten zu einer Bandierung im CsCl-Dichtegradienten bei unterschiedlichen spezifischen Dichten führen, was sich im A_{260}-Profil nicht zeigt, sich aber in mehreren Ratioaktivitätspeaks nach der Hybridisierung äußern würde.

Für eine andere Gengruppe bei Säugetieren konnte das Auftreten mehrerer Genpopulationen schon gezeigt werden. So identifizierte Stambrook (1976) zwei separate DNA-Komponenten, die beide gegen markierte 5S RNA hybridisierten und die sich aufgrund ihres unterschiedlichen G+C-Gehaltes in den benachbarten Spacer-Regionen unterscheiden, was eine Bandierung bei unterschiedlichen spezifischen Dichten im CsCl-Dichtegradienten zur Folge hat.

Die Untersuchung der Bedeutung der chromosomalen Lokalisierung bestimmter Gene im eukaryontischen Genom für die Replikation bestimmter Gene aber auch für die Genregulation ist erschwert durch die Komplexität des eukaryontischen Genoms und auch durch den diploiden Status der tierischen Zellen. So erbrachten in situ-Hybridisierungen die Schwierigkeit, Gene, die nur in einer Kopie im haploiden Genom vorliegen, mit dieser Methode zu entdecken. Erst die Kombination dieser Methode mit der Verwendung von

Zellhybriden, die z.B. eine unterschiedliche Anzahl menschlicher Chromosomen besitzen, erbrachten zum Beispiel den Beweis, daß das menschliche α-Globingen auf dem Chromosom 16 lokalisiert ist (Deisseroth et al., 1977), während die Strukturgene für das β- und γ-Globin dem Chromosom 11 zugeordnet werden konnten.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß funktionell in Beziehung stehende Gene im eukaryontischen Genom nicht in unmittelbarer Nachbarschaft angeordnet sein müssen. Im Gegensatz dazu sind in prokaryontischen Systemen oft die Gene der Enzyme eines Stoffwechselweges in Form eines Operons hintereinandergeschaltet, das als eine polycicstronische Einheit transcribiert wird. In Eukaryonten muß es also Mechanismen geben, die die gleichzeitige Expression von in Beziehung stehenden Gegen, die aber auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, kontrollieren. Die vielfachen Kopien der ribosomalen Gene allerdings sind in manchen Eukaryonten auf einem Chromosom lokalisiert. Hughes et al. (1979) folgern daraus, daß es für die eukaryontische Zelle nicht Bedingung ist, daß funktionell in Beziehung stehende Gengruppen auch auf einem Chromosom verbunden sein müssen, um eine koordinierte Regulation möglich zu machen, daß aber Gene, die in vielfachen identischen oder fast identischen Kopien im Genom vorliegen, möglicherweise bedingt durch ihren Entstehungsmechanismus durch Duplikation oder Rekombination, auf einem Chromosom lokalisiert sind. Das erleichtert möglicherweise ihre Regulation und äußert sich wie im Falle der ribosomalen Gene durch die Synthese eines hochmolekularen Precursors für die beiden großen RNA-Spezies.

Diese Interpretation würde auch für die Drosophila-Histongene zutreffen, deren 110 Kopien auf einen chromosomalen Lokus beschränkt sind. Weiterhin ist im Einklang mit diesem Befund der Hinweis, daß die Kopien der menschlichen Histongene möglicherweise ebenfalls auf einem Chromosom zu finden sind. Inwieweit die eukaryontische Zelle diese Gegebenheiten hinsichtlich der Replikation dieser Gengruppen aus-

nutzt, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nur schwer beantwortet werden. Sie besitzt sicherlich noch andere Regulationsmechanismen, die dann auch dominierend sein können. Sie hat weiterhin auch das Potential, Vorgänge an verschiedenen Chromosomen synchronisieren zu können.

Einen eng begrenzten Replikationszeitraum weisen, wie schon beschrieben, die ribosomalen Gene des Chinese Hamsters auf. Hier liegen die ribosomalen Gene auf einem Chromosom. Zeitlich eng eingrenzbar ist auch die Replikation der Satelliten-DNA, die zwar auf jedem einzelnen Chromosom einer bestimmten Region zugeordnet werden kann, die aber auf mehreren Chromosomen verteilt vorliegt. Eine gemeinsame Replikation in einem eng begrenzten Zeitraum der S-Phase ist auch in diesem Fall leicht vorstellbar. Für eine gewisse Bedeutung der chromosomalen Verteilung bestimmter DNA-Sequenzen im Hinblick auf eine Begünstigung einer gemeinsamen Replikation sprechen auch die Daten über die Replikation der ribosomalen Gene in HeLa-Zellen. Diese liegen dort auf mehreren Chromosomen, und die Replikation umfaßt die Dauer der gesamten S-Phase (Balazs und Schildkraut, 1971).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse über die Replikation der Histongene würden eher daraufhin deuten, daß ein Teil dieser Gene in HeLa-Zellen auf mehreren Chromosomen lokalisiert ist. Das würde dann mit der über die ganze S-Phase anhaltenden Replikation der ribosomalen Gene in HeLa-Zellen im Einklang stehen. Die Replikation der Histongene in HeLa-Zellen läuft allerdings nicht synchron mit der gesamten DNA-Synthese ab, sondern erreicht ihren maximalen Wert vor dem Synthesemaximum der gesamten DNA. Möglicherweise trifft für die HeLa-Zelle zu, daß sie Regulationsmechanismen verloren hat, die z.B. eine gemeinsame Replikation bestimmter DNA-Sequenzen, die auf unterschiedlichen Chromosomen liegen, ermöglichen. Nicht ganz in Einklang zu bringen ist damit allerdings das Replikationsmuster für die 5S RNA-Gene in HeLa-Zellen das Ho und Armentrout (1978) untersuchten. Die 5S RNA-Gene scheinen nämlich, obwohl auf mehreren Chromosomen verteilt, gemein-

sam in der ersten Hälfte der S-Phase repliziert zu werden. Gänzlich widersprochen werden aber kann der These nicht, daß eine synchrone Replikation bestimmter DNA-Abschnitte begünstigt wird durch ein gemeinsames Vorliegen dieser DNA-Abschnitte auf einem Chromosom. Sicherlich sind aber noch weitere Regulationsmechanismen für eine koordinierte Replikation verantwortlich.

Eine weitere Möglichkeit, vorliegende physiologische Daten auf dem Niveau der Genregulation erklären zu können, ergibt sich aus der Tatsache, daß auch in HeLa-Zellen eine Kopplung zwischen DNA-Synthese-Periode und Histonsynthese besteht. Die Zelle könnte die Anforderungen an die Syntheseleistung - unter der Voraussetzung, daß die Transcription die Kontrollebene für diese Kopplung ist - so beantworten, daß sie Regulationsmöglichkeiten schafft, die eine möglichst frühe Replikation der Histongene bewirken. Damit würden weitere DNA-Matrizen für die Transcription zur Verfügung stehen. Aus dem Replikationsmuster der Histongene geht zwar für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche hervor, daß schon in der ersten Stunde der S-Phase Replikation der Histongene vonstatten geht, allerdings werden nur etwa 6 bis 7% der Histongene während der Zeit maximaler Transcription dieser Gene repliziert. Eine aktive Replikation der Histongene setzt erst in der zweiten Stunde der S-Phase ein, wenn die Transcriptionsaktivität dieser Gene bereits wieder abfällt (Breindl und Gallwitz, 1973). Es ist also keineswegs augenfällig, daß durch eine frühe Replikation der Histongene ein Gendosiseffekt erreicht wird, der mehr Matrizen-DNA zur Herstellung der benötigten Histon-mRNAs bereitstellt.

V. Zusammenfassung

1. Die Replikation der Histongene, wie sie sich aus Hybridisierungsexperimenten mit HeLa-DNA, die in 1-Stunden-Intervallen über die Dauer der gesamten S-Phase mit 5-Bromdesoxyuridin markiert wurde, und ^{32}P-markierter komplementärer RNA (cRNA) von Seeigel-Histon-DNA ergibt, erstreckt sich über die Dauer der gesamten S-Phase. In beiden durchgeführten Versuchen liegt jedoch das Maximum der Histongenreplikation vor dem der gesamten DNA-Synthese. So werden zwischen der zweiten und vierten Stunde der S-Phase bis zu 40% der Histongene repliziert.

2. Die Hybridisierung von restriktionsverdauter Gesamt-HeLa-DNA, die auf Agarose-Gelen aufgetrennt und nach der Methode von Southern (1975) auf Nitrocellulose-Filter transferiert wurde, zeigt bei beiden verwendeten Hybridisierungsproben gemeinsam auftretende Hybridisierungsbanden.

3. Bei der Hybridisierung von auf CsCl-Dichtegradienten fraktionierter HeLa- und Placenta-DNA gegen eine ^{32}P-markierte cRNA von dem Seeigel-Histongen-Insert des Plasmids pCO2 bzw. von dem Plasmid pTS 306, das das H4-Gen enthält, treten mehrgipfelige Radioaktivitätspeaks auf.

Der Befund 2 liefert Hinweise, daß auch in HeLa-Zellen, wie für Seeigel und Drosophila schon beschrieben, eine geclusterte Organisationsform der Histongene vorliegen könnte. Wie aus dem Befund 1 aber zu ersehen ist, scheint diese Organisationsform die Replikation der Histongene in HeLa-Zellen nicht in dem Sinn zu begünstigen, daß sie innerhalb eines eng begrenzten Zeitraums abläuft.

Die Befunde 2 und 3 weisen daraufhin, daß die für Seeigel und Drosophila beschriebene Heterogenität der Histongencluster möglicherweise auch für HeLa-Zellen zutrifft. Das Auftreten mehrerer Hybridisierungsbanden läßt sich wie folgt interpretieren:

a. Die einzelnen Histongencluster unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Länge und

b. Sequenzunterschiede innerhalb der einzelnen Cluster führen dazu, daß neue Restriktionsschnittstellen geschaffen werden, andere aber entfallen.

Das Auftreten mehrgipfeliger Radioaktivitätspeaks könnte auf eine unterschiedliche Basenzusammensetzung der einzelnen Histongencluster zurückzuführen sein. Diese könnte sich in einem unterschiedlichen A+T-Gehalt der Spacer-DNA äußern, was zu einer unterschiedlichen Bandierung im CsCl-Dichte-gradienten führen würde, die durch die Hybridisierung sichtbar würde.

Die sich aus dem Befund 1 ergebenden Möglichkeiten hinsichtlich einer möglichen Verbindung zwischen dem Replikationsmuster bestimmter Gene und deren chromosomaler Verteilung lassen sich nur schwer bewerten. Das Replikationsmuster der Histongene deutet aber eher daraufhin, daß die Gene in HeLa-Zellen auf mehreren Chromosomen lokalisiert sind und daß eine gemeinsame Replikation dieser Gene nicht koordiniert werden kann.

Obwohl die Replikation der Histongene mit dem Beginn der S-Phase startet, schließen die Werte für die erste Stunde der S-Phase von 6 bis 7% der gesamten Replikation eine effiziente regulatorische Funktion der Histongenreplikation auf die Histonsynthese selbst aus.

VI. Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BrdUrd	5-Bromdesoxyuridin
C	Cytidin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
kb	Kilobasen
mRNA	Messenger RNA
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
ρ	Dichte
S	Sedimentationskonstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Phase	DNA-Synthese-Phase
SSC	0,15 M NaCl, 0,015 M Na-Citrat
T	Thymidin
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UTP	Uridintriphosphat

VII. Literaturverzeichnis

Adams, R.L.P., Lindsay, J.G. (1967)
Hydroxyurea - reversal of inhibition and use as a cell synchronizing agent. Proc.Nat.Acad.Sci. 63, 378-383

Adesnik, M., Darnell, J.E. (1972)
Biogenesis and characterization of Histone messenger RNA in HeLa cells. J.Mol.Biol. 67, 397-406

Aloni, Y., Hatlen, L.E., Attardi, G. (1971)
Studies of fractionated HeLa cell metaphase chromosomes II. Chromosomal distribution of sites for transfer RNA and 5S RNA. J.Mol.Biol. 56, 555-563

Arceri, R.J., Senger, D.R., Gross, P.R. (1976)
The programmed switch in lysine-rich histone synthesis at gastrulation. Cell 9, 171-178

Balazs, I., Schildkraut, C.L. (1971)
DNA replication in synchronized cultured mammalian cells II. Replication of ribosomal cistrons in Thymidine-synchronized HeLa cells. J.Mol.Biol. 57, 153-158

Birnstiel, M.L., Schaffner, W., Smith, H.A. (1977)
DNA sequences coding for the H2B histone of Psammechinus miliaris. Nature 266, 603-607

Birnstiel, M., Telford, J., Weinberg, E., Stafford, D. (1974)
Isolation and some properties of the genes coding for histone proteins. Proc.Nat.Acad.Sci. 71, 2900-2904

Blin, N., Stafford, D.W. (1976)
A general method for isolation of high molecular weight DNA from Eukaryotes. Nucl.Acid Res. 3, 2303-2308

Borun, T.W., Scharff, M.D., Robbins, E. (1967)
Rapidly labelled, polysome-associated RNA having properties of histone messenger. Proc.Nat.Acad.Sci. 58, 1977-1983

Bostock, C.J., Prescott, D.M. (1971)
Buoyant density of DNA synthesized at different stages of the S-phase of mouse-L-cells. Exp.Cell Res. 64, 267-274

Bostock, C.J., Prescott, D.M., Hatch, F.T. (1972)
Timing of replication of the satellite and main band DNAs in cells of the Kangaroo rat (Dipodomys ordii). Exptl.Cell Res. 74, 487-495

Brandt, W.F., Strickland, W.N., Strickland, M., Carlisle, L., Woodes, D., Von Holt, C. (1979)
A histone programme during the life cycle of the sea urchin. Eur.J.Biochem. 94, 1-10

Breindl, M., Gallwitz, D. (1973)
Identification of histone mRNA from HeLa cells. Appearance of histone mRNA in the cytoplasm and its translation in a rabbit reticolocyte cell-free system. Eur.J.Biochem. 32, 381-391

Breindl, M., Gallwitz, D. (1974)
On the translational control of Histone synthesis. Quantitation of biologically active histone mRNA from synchronized HeLa cells and its translation in different cell-free systems. Eur.J.Biochem. 45, 91-97

Brown, S.W. (1966)
Heterochromatin. Science 151, 417-425

Cohen, L.H., Newrock, K.M., Zweidler, A. (1975)
Stage-specific switches in histone synthesis during embryogenesis of the sea urchin. Science 190, 994-997

Cohn, R.H., Lowry, J.C., Kedes, L.H. (1976)
Histone genes of the sea urchin (S.purpuratus) cloned in E.coli: order, polarity and strandedness of the five histone coding and spacer regions. Cell 9, 147-161

Deisseroth, A., Nienhuis, A., Lawrence, J., Giles, R., Turner, P., Ruddle, F. (1978)
Proc.Nat.Acad.Sci. 75, 1456-1460

Deisseroth, A., Nienhuis, A., Turner, P., Velez, R., Anderson, W.F., Ruddle, F., Lawrence, J., Creagan, R., Kucherlapati, R. (1977)
Localization of the human α-globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular assay. Cell 12, 205-218

Farquar, M.N., McCarthy, B.J. (1973)
Evolutionary stability of the histone genes of sea urchins. Biochemistry 12, 4113-4122

Flamm, W.G., Bernheim, N.J., Brubaker, P.E. (1971)
Density gradient analysis of newly replicated DNA from synchronized mouse lymphoma cells. Exptl. Cell Res. 64, 97-104

Gallwitz, D. (1975)
Kinetics of inactivation of histone mRNA in the cytoplasm after inhibition of DNA replication in Synchronized HeLa cells. Nature 257, 247-248

Gallwitz, D., Mueller, G.C. (1969)
Histone synthesis in vitro on HeLa cell microsomes. The nature of the coupling to deoxyribonucleic acid synthesis. J.Biol.Chem. 224, 5947-5952

Gallwitz, D., Mueller, G.C. (1970)
RNA from HeLa cell microsomes with properties of histone messenger. FEBS-Letters 6, 83-85

Gillespie, D., Spiegelman, S. (1965)
A quantitative assay dor DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. J.Mol.Biol. 12, 829-842

Gross, K., Probst, E., Schaffner, W., Birnstiel, M. (1976)
Molecular analysis of the histone gene cluster of Psammechinus miliaris. I. Fractionation and identification of five individual histone mRNAs. Cell 8, 455-469

Grunstein, M., Schedl, P., Kedes, L.H. (1976)
Sequence analysis and evolution of sea urchin (Lytechinus pictus and Strongylocentrotus purpuratus) histone H4 messenger RNAs. J.Mol.Biol. 104, 351-369

Hackett, P.B., Traub, P., Gallwitz, D. (1978)
The histone genes on HeLa cells are on individual transcriptional units. J.Mol.Biol. 126, 619-635

Ho, C., Armentrout, R.W. (1978)
Replication of the genes coding for 5S RNA in synchronized HeLa cells. Biochim.Biophys.Acta 520, 175-183

Hofstetter, H., Schamböck, A., Vandenberg, J., Weissman C. (1976)
Specific excision of the inserted DNA segment from hybrid plasmids constructed by the poly (dA) - poly (dT) method. Biochim.Biophys.Acta 454, 587-591

Hsu, T.C. (1964)
Mammalian chromosomes in vitro. XVIII. DNA replication sequence in the Chinese hamster. J.Cell Biol. 23, 53-62

Hsu, T.C. Brinkley, B.R., Areghi, E.F. (1967)
The structure and behavior of the nucleolus organizers im mammalian cells. Chromosoma 23, 137-153

Huberman, J.A., Attardi, G. (1967)
Studies of fractionated HeLa cell metaphase chromosomes. I. The chromosomal distribution of DNA complementary to 28S and 18S RNA and to cytoplasmic RNA. J.Mol.Biol. 29, 487-505

Huberman, J.A., Riggs, A.D. (1968)
On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. J.Mol.Biol. 32, 327-341

Hughes, S.H., Stubblefield, E., Payvar, F., Engel, J.D., Dodgson, J.B., Spector, D., Cordell, B., Schimke, R., Varmus, H.A. (1979)
Gene localization by chromosome fractionation: globin genes are on at least two chromosomes and three estrogen inducible genes are on three chromosomes. Prov.Nat.Acad.Sci. 76, 1348-1352

Jacobs-Lorena, M., Baglioni, C., Borun, T.W. (1972)
Translation of messenger RNA for histones from HeLa cells by a cell-free extract from mouse ascites tumor. Proc.Nat.Acad.Sci. 69, 2095-2099

Jones, K.W. (1970)
Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. Nature 225, 912-915

Kajiwara, K., Mueller, G.C. (1964)
Molecular events in the reproduction of animal cells.

III. Fractional synthesis of deoxyribonucleic acid with 5-Bromdeoxyuridine and its effect on cloning efficiency. Biochim.Biophys.Acta 91. 486-493

Kedes, L.H. (1979)
Histone genes and messengers. Ann.Rev.Biochem. (in Vorbereitung)

Kedes, L.H., Birnstiel, M.L. (1971)
Reiteration and clustering of DNA sequences complementary to histone messenger RNA. Nature 230, 165-169

Kedes, L.H., Chang, A.C.Y., Houseman, D., Cohen, S.N. (1975a)
Isolation of histone genes from unfractionated sea urchin DNA by subculture cloning in E.coli. Nature 255, 533-538

Kedes, L.H., Cohn, R.H., Lowry, J.C., Chang, C.Y., Cohen, S.N. (1975b)
The organisation of sea urchin histone genes. Cell 6, 359-369

Kedes, L.H., Gross, P.R. (1969)
Identification in cleaving embryos of three RNA species serving as templates for the synthesis of nuclear proteins. Nature 223. 1335-1339

Kunkel, N.S., Hemminki, K., Weinberg, E.S. (1978)
Size of histone gene transcripts in different embryonic stages of the sea urchin S.purpuratus. Biochemistry 17, 2591-2598

Kunkel, N.S., Weinberg, E.S. (1978)
Histone gene transcripts in the cleavage and mesenchyme blastula embryo of the sea urchin S.purpuratus. Cell 14, 313-326

Lifton, R.P., Goldberg, M.L., Karp, R.W., Hogness, D.S. (1977)
The organization of the histone genes in Drosophila melanogaster. Functional and evolutionary implications. Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 42, 1047-1051

Lima-de-Faria, A. (1959)
Differential uptake of tritiated Thymidine into

hetero- and euchromatin in Melanoplus and Secale. J.Biophys.Biochem.Cytol. 6, 457-466

McDonell, M.W., Simon, M.N., Studier, F.W. (1977)
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutrale and alkaline gradients. J.Mol.Biol. 110, 119-146

Melli, M., Spinelli, G., Arnold, E. (1977)
Synthesis of histone messenter RNA of HeLa cells during the cell cycle. Cell 12, 167-174

Melli, M., Spinelli, G., Wyssling, H., Arnold, E. (1977)
Presence of histone mRNA sequences in high molecular weight RNA of HeLa cells. Cell 11, 651-661

Mueller, G.C., Kajiwara, K. (1966)
Early and late replicating deoxyribonucleic acid complexes in HeLa nuclei. Biochim.Biophys.Acta 114, 108-115

Newrock, K.M., Cohen, L.H., Hendricks, M.B., Donelly, R.J., Weinberg, E.S. (1978)
Stage-specific mRNAs coding for subtypes of H2A and H2B histones in the sea urchin embryo. Cell 14, 327-336

Overton, G.C., Weinberg, E.S. (1978)
Length and sequence heterogenity of the histone gene repeat unit of the sea urchin S.purpuratus. Cell 14, 247-257

Painter, R.B., Schaefer, A.W. (1971)
Variation in the rate of DNA chain growth through the S-phase in HeLa cells. J.Mol.Biol. 58, 289-295

Pardue, M.L., Gall., J.G. (1970)
Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science 168, 1356-1358

Pardue, M.L., Weinberg, E.S., Kedes, L.H., Birnstiel, M. (1972)
Localization of sequences coding for histone messenger RNA in the chromosomes of Drosophila melanogaster. J. Cell Biol. 55, 199a

Perry, R.T., Kelly, D.E. (1973)
Messenger RNA turnover in mouse L cells. J.Mol.Biol. 79, 681-696

Portmann, R., Schaffner, W., Birnstiel, M. (1976)
Partial denaturation mapping of cloned histone DNA from the sea urchin Ps.miliaris. Nature 264, 31-34

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977)
Labeling Deoxyribonucleic Acid to high specific activity in-vitro by nick translation with DNA Polymerase I. J.Mol.Biol. 113, 237-251

Robbins, E., Borun, T.W. (1967)
The cytoplasmic synthesis of histones in HeLa cells and its temporal relationship to DNA-replication. Proc.Nat.Acad.Sci. 57, 409-416

Schaffner, W., Gross, K., Telford, J., Birnstiel, M. (1976)
Molecular analysis of the histone gene cluster of Psammechinus miliaris: II. The arrangement of the five histone coding and spacer sequences. Cell 8, 471-478

Schaffner, W., Kunz, G., Daetwyler, H., Telford, J., Smith, H.O., Birnstiel, M.L. (1978)
Genes and spacers of cloned sea urchin histone DNA analyzed by sequencing. Cell 14, 665-671

Schildkraut, C.L., Maio, J.J. (1969)
Fractions of HeLa DNA differing in their content of Guanine + Cytosine. J.Mol.Biol. 46, 305-312

Schildkraut, C.L., Marmur, J., Doty, P. (1962)
Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its bouyant density in CsCl. J.Mol.Biol. 4, 430-443

Southern, E.M. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol. 98, 503-517

Spalding, J., Kajiwara, K., Mueller, G.C. (1966)
The metabolism of basic proteins in HeLa cell nuclei. Proc.Nat.Acad.Sci. 56, 1535-1542

Spinelli, G., Gianguzza, F., Casaiyo, C., Aciemo, R., Burckhardt, J. (1979)
Evidences of two different sets of histone genes active during embryogenesis of the sea urchin Paracentrotus lividus. Nuc.Acid Res. 6, 545-560

Stambrook, P.J. (1974)
The temporal replication of ribosomal genes in synchronized Chinese hamster cells. J.Mol.Biol. 82, 303-313

Stambrook, P.J. (1976)
Organization of the genes coding for 5S RNA in the Chinese hamster. Nature 259, 639-641

Stein, L.J., Thrall, C.L., Park, W.D., Mans, R.J., Stein, G.S. (1975)
Hybridization analysis of histone messenger RNA: Association with polyribosomes during the cell cycle. Science 189, 557-558

Sures, I., Lowry, J., Kedes, L.H. (1978)
The DNA sequence of sea urchin (S.purpuratus) H2A, H2B and H3 histone coding and spacer regions. Cell 15, 1033-1044

Sures, I., Maxam, A., Cohn, R.H., Kedes, L.H. (1976)
Identification and location of the histone H2A and H3 genes by sequence analysis of sea urchin (S.purpuratus) DNA cloned in E.coli. Cell 9, 495-502

Taylor, J.H. (1960)
Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster. J.Biophys.Biochem.Cytol. 7, 455-463

Tobia, A.M., Brown, E.H., Parker, R.J., Schildkraut, C.L., Maio, J.J. (1972)
DNA replication in synchronized cultured mammalian cells. IV. Replication of African Green Monkey component and bulk DNA. Biochim.Biophys.Acta 277, 256-268

Weinberg, E.S., Birnstiel, M.L., Purdom, I.F., Williamson, R. (1972)

Genes coding for polysomal 9S RNA of sea urchins: conservation and divergence. Nature 240, 225-228

Wilkes, P.R., Birnie, G.D., Old, R.W. (1978)
Histone gene expression during the cell cycle studied by in situ hybridisation. Exptl.Cell Res. 115, 441-444

Wilson, M.C., Melli, M., Birnstiel, M.L. (1974)
Reiteration frequency of histone coding sequences in man. Biochim.Biophys.Res.Commun. 61, 404-409

Wilson, M.C., Melli, M. (1977)
Determination of the number of histone genes in human DNA. J.Mol.Biol. 110, 511-535

Wu, M., Holmes, D.S., Davidson, N., Cohn, R.H., Kedes, L.H. (1976)
The relative positions of sea urchin histone genes on the chimeric plasmids psp 2 and psp 17 as studied by electron microscopy. Cell 9, 163-169

Yasmineh, W.G., Yunis, J.J. (1970)
Localization of mouse satellite DNA in constitutive heterochromatin. Exptl.Cell Res. 59, 69-75

Yu, L.C., Szabo, P., Borun, T.W., Prensky, W. (1978)
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 42, 1101-1105

Lebenslauf

16.10.1952	geboren in Lollar als Tochter der Eheleute Gertrud Moos geb. Römer und Karl Albert Moos
1959-1963	Besuch der Volksschule in Lollar
1963-1971	Besuch des neusprachlich/naturwissenschaftlichen Gymnasiums Herderschule in Gießen
8.6.1971	Reifeprüfung
1971-1976	Studium der Ernährungswissenschaften in Gießen mit abschließender Diplomprüfung
1.1.1977	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Gallwitz

Meine akademischen Lehrer waren:

in Gießen: Brune, Elmadfa, Feldheim, Hofmann, Jahn, Kielwein, Kilian, Küster, Linser, Matthes, Menden, Meyer, Mueller, Neumann, Peters, Rehner, Renner, v. Schweitzer, Seifert, Steubing

in Marburg: Azis, Beato, Gallwitz, Karlson, v. Kraft, Mannheim, Niessing, Radsak, Schachtschabel, Schiff, Schneider, Seifart, Siegert, Slenska, Wiegandt.